

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATHEUS LUIS CASTELAN TRILICO

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E NEUROFISIOLÓGICA DA  
ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA TIPO 8 LIGADA À MUTAÇÃO *p.P56S* NO  
GENE *VAPB*

CURITIBA

2021

MATHEUS LUIS CASTELAN TRILICO

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E NEUROFISIOLÓGICA DA  
ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA TIPO 8 LIGADA À MUTAÇÃO *p.P56S* NO  
GENE *VAPB*

Projeto submetido como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Medicina Interna, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rosana Herminia Scola

CURITIBA

2021

T829      Trilico, Matheus Luis Castelan  
Caracterização clínica, laboratorial e neurofisiológica da  
esclerose lateral amiotrófica tipo 8 ligada à mutação p.P56S  
no gene VAPB [recurso eletrônico] / Matheus Luis Castelan  
Trilico. – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade  
Federal do Paraná.  
Orientadora: Profa. Dra. Rosana Herminia Scola

1. Esclerose amiotrófica lateral. 2. Doença do neurônio  
motor. I. Scola, Rosana Herminia. II. Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde.  
Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLM: WE 552

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MATHEUS LUIS CASTELAN TRILICO** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E NEUROFISIOLÓGICA DA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA TIPO 8 LIGADA À MUTAÇÃO p.P56S NO GENE VAPB**, sob orientação da Profa. Dra. ROSANA HERMINIA SCOLA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 12 de Janeiro de 2021.

Assinatura Eletrônica

12/01/2021 11:36:53.0

ROSANA HERMINIA SCOLA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/01/2021 11:52:46.0

CARLOS EDUARDO SOARES SILVADO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/01/2021 19:02:02.0

MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JÚNIOR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

A todos os pacientes que contribuíram com a realização deste estudo, acreditando que a ciência um dia mudará a história natural desta doença.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que sempre escreveu certo, mesmo quando as linhas pareciam tortas.

À Poliana, minha maior dádiva, por me ensinar a cada dia o real valor da vida e a procurar a beleza da felicidade, mesmo quando essa parece se esconder.

À Larissa, minha esposa, que durante o meu tempo dispendido neste projeto, supriu eximamente minha ausência como pai.

Aos meus pais, Luis e Tânia, ao meu irmão Gabriel e, principalmente, aos meus avós Antônio e Zenaide, por terem sido pedra angular no meu desenvolvimento pessoal.

À Professora Dra. Rosana Herminia Scola, a maior responsável por esta pesquisa, por ter me incentivado, acreditado neste projeto e dedicado seu precioso tempo em me guiar e me orientar com excelência.

Ao Dr. Paulo José Lorenzoni, por todo apoio principalmente com a parte genética da pesquisa, sem a qual essa dissertação jamais existiria.

Ao Professor Dr. Lineu César Werneck, que sempre lutou pelo reconhecimento científico do Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

Aos neurologistas e colegas Dra. Cláudia Suemi Kamoi Kay, Professor Dr. Marcos Christiano Lange, Professor Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive, Professor Dr. Pedro A. Kowacs, Dr. Francisco Manoel Branco Germiniani e Dra Renata Dal-Prá Ducci por terem me ensinado a como executar a arte da neurologia com excelência durante minha especialização.

Aos meus amigos de residência médica pelos bons momentos e aprendizados que vivemos juntos.

Ao Dr. Otto Fustes, por ter colaborado ampliando as ferramentas de investigação nesse projeto.

À Raquel Arndt e Nyvia Hrysay, que colaboraram com a parte laboratorial da pesquisa.

A todos os pacientes pela generosidade e altruísmo de terem participado voluntariamente desta pesquisa acreditando na progressão da ciência.

A todos que, mesmo não tendo sido citados, participaram de alguma forma deste projeto, sendo corresponsáveis pela sua realização.

*“Em tudo há sempre uma coisa boa para se ser grato se você procurar o suficiente para descobrir onde está.”*

*(Eleanor H. Porter)*

## RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma rara doença neurodegenerativa e heterogênea presente no mundo todo, com formas esporádicas e familiares. Um subtipo autossômico dominante raro de ELA familiar foi identificado em uma família brasileira e classificado como ELA tipo 8 (ELA8) ligada ao gene *VAPB*. O objetivo do nosso estudo foi analisar uma série de pacientes com ELA8 de famílias não relacionadas a fim de caracterizar a doença. Revisamos apenas os pacientes com ELA provável ou definida de acordo com os critérios de Awaji e em acompanhamento em um único centro entre 2004 e 2018, tendo amostras de material biológico disponíveis para análise genética. Uma análise retrospectiva das características clínicas, laboratoriais e neurofisiológicas foi realizada, dados relevantes foram registrados e o DNA foi analisado para detectar a mutação *p.P56S* do gene *VAPB*. Dentre os pacientes com ELA, 31 eram elegíveis para triagem genética deste subtipo, sendo a mutação detectada em cinco pacientes de famílias não relacionadas. A idade média de início foi de  $45 \pm 5,3$  anos para o grupo ELA8 e  $47,6 \pm 13,1$  anos para o grupo não-ELA8; o tempo entre o início dos sintomas e a última avaliação foi maior para os pacientes com ELA8. Três pacientes no grupo ELA8 tiveram tremor (60%), quatro tiveram dor no membro afetado (80%) e todos tiveram câibras e protrusão abdominal. Este estudo apresenta a maior série de pacientes com ELA8 no sul do Brasil. Nossos resultados demonstram várias características clínicas que podem ser atributos da ELA8 e confirmam que os médicos devem suspeitar desta variante quando as manifestações clínicas incluírem câibras, protrusão abdominal, dor e tremor.

Palavras-chave: Esclerose lateral amiotrófica. Doença do neurônio motor. *VAPB*.



## ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare worldwide heterogeneous neurodegenerative disease with sporadic and familial forms. A rare autosomal dominant subtype of familial ALS was identified in a Brazilian family, classified as ALS type 8 (ALS8) linked to the *VAPB* gene. The aim of our study was to analyze a series of ALS8 patients from unrelated families in order to further characterize the disease. We reviewed only patients with probable or definite ALS according to the Awaji criteria being managed at a single center between 2004 and 2018 and with biological samples available for genetic analysis. A retrospective analysis of clinical, laboratory, and electrophysiological features was performed, relevant data were recorded and DNA was analyzed to detect *p.P56S VAPB* gene mutation. Thirty-one ALS patients were eligible for genetic screening for ALS8 and the mutation was detected in five patients from unrelated families. The mean age of onset was  $45 \pm 5.3$  years for the ALS8 group and  $47.6 \pm 13.1$  years for the non-ALS8 group and the time between symptom onset and last follow-up was longer for ALS8 patients. Three patients in the ALS8 group had tremor (60%), four had pain in affected limb (80%) and all had cramps and abdominal protrusion. This study presents the largest series of ALS8 patients in southern Brazil. Our findings demonstrate several clinical features that may be characteristic of ALS8 and confirm that clinicians should suspect ALS8 when the clinical manifestations include cramps, abdominal protrusion, pain, and tremor.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis. Motor Neuron Disease. *VAPB*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais características clínicas e variantes fenotípicas da ELA.....	18
FIGURA 2 – Principais genes e mecanismos envolvidos na fisiopatologia da ELA ..	22
FIGURA 3 - Exemplo de PCR-RFLP e sequenciamento pela técnica de Sanger no paciente ID 14.....	38
FIGURA 4 - Protrusão abdominal nos pacientes ELA8.....	44
FIGURA 5 – Ressonância Magnética de coxa esquerda do paciente ID 32. ....	47

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Principais tipos de ELA familiar, genes envolvidos e suas características. ....	21
QUADRO 2 - Diagnósticos diferenciais para ELA .....	29
QUADRO 3 - Principais achados na forma <i>VAPB</i> da ELA. ....	34
QUADRO 4 - Critérios de Awaji para ELA.....	35

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Reagentes e volumes para PCR linear .....	40
TABELA 2 - Distribuição dos casos catalogados como doença do neurônio motor e com material genético disponível no período de 2004 a 2018. ....	42
TABELA 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com ELA.....	43
TABELA 4 – Principais achados clínicos característicos da ELA8. ....	44
TABELA 5 – Principais achados clínicos individualizados nos pacientes ELA8.....	45
TABELA 6 – Principais achados do estudo de condução nervosa nos pacientes ELA8 estudados.....	45
TABELA 7 – Principais achados da eletromiografia de agulha nos pacientes ELA8 estudados.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	- Autossômico Dominante
AEC2	- Atrofia Espino-Cerebelar tipo 2
ALS2	- <i>Alsin</i>
ALSoD	- <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis online Database</i>
AME	- Atrofia Muscular Espinhal
AMP	- Atrofia Muscular Progressiva
ANG	- <i>Angiogenin</i>
AR	- Autossômico Recessivo
ATXN2	- <i>Ataxin 2</i>
BI	- Bilateral
C21orf2	- <i>Chromosome 21 Open Reading Frame 2</i>
C9ORF72	- <i>Chromosome 9 Open Reading Frame 72</i>
CHCHD10	- <i>Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10</i>
CHC	- Complexo Hospital de Clínicas
CHMP2B	- <i>Charged Multivesicular Body Protein 2B</i>
CK	- Creatinoquinase
DCTN	- <i>Dynactin</i>
ddNTPs	- <i>di-deoxynucleotidetriphosphates</i>
DFT	- Demência Fronto-Temporal
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	- <i>deoxynucleotidetriphosphates</i>
EDTA	- <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELA	- Esclerose Lateral Amiotrófica
ELA8	- Esclerose Lateral Amiotrófica subtipo 8
ELP	- Esclerose Lateral Primária
ELP3	- <i>Encoding Elongator Complex Protein 3</i>
ENMG	- Eletroneuromiografia
ERQC	- <i>Endoplasmic Reticulum Quality Control</i>
EWSR1	- <i>Encoding RNA-binding Protein EWS</i>
EXO I	- <i>Exonuclease I</i>
FAN	- Fator Antinuclear

<i>FUS</i>	- <i>Fused in Sarcoma</i>
<i>HNRNPA2B1</i>	- <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2-B1</i>
<i>HNRPA1</i>	- <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1</i>
ID	- Código de Identificação
<i>MATR3</i>	- <i>Matrin 3</i>
MI	- Membro Inferior
MMII	- Membros Inferiores
MMSS	- Membros Superiores
MS	- Membro Superior
<i>NEK1</i>	- <i>NIMA-related Kinase 1</i>
NMI	- Neurônio Motor Inferior
NMp	- Neurônio Motor Predominante
NMS	- Neurônio Motor Superior
<i>OPTN</i>	- <i>Optineurin</i>
PA	- Protrusão Abdominal
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PFN1</i>	- <i>Profilin 1</i>
PTH	- Paratormônio
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RNA	- Ácido Ribonucleico
RNM	- Ressonância Nuclear Magnética
SAP	- <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
<i>SETX</i>	- <i>Senataxin</i>
<i>SIGMAR1</i>	- <i>Sigma Non-Opioid Intracellular Receptor 1</i>
<i>SOD1</i>	- <i>Superoxide Dismutase 1</i>
<i>SPG11</i>	- <i>Spastic Paraplegia 11 Gene</i>
SPSS	- <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<i>SQSTM1</i>	- <i>Sequestosome 1</i>
<i>TAF15</i>	- <i>Encoding TATA-binding Protein-Associated Factor 2N</i>
<i>TARDBP</i>	- <i>TAR DNA-binding protein 43</i>
<i>TARDP</i>	- <i>TAR DNA-binding protein 43</i>
<i>TBK1</i>	- <i>TANK-binding Kinase 1</i>
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TSH	- Hormônio Tireoestimulante
<i>TUBA4A</i>	- <i>Tubulin <math>\alpha</math>4A</i>
<i>UBQLN2</i>	- <i>Ubiquilin-2</i>
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UM	- Unilateral
<i>UNC13A</i>	- <i>Unc-13 Homolog A</i>
UPR	- <i>Unfolded Protein Response</i>
VAP	- <i>Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated</i>
<i>VAPA</i>	- <i>Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein A</i>
<i>VAPB</i>	- <i>Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein B</i>
<i>VAPC</i>	- <i>Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein C</i>
<i>VCP</i>	- <i>Valosin-Containing Protein</i>
VHS	- Velocidade de Hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA	19
1.1.1 Fisiopatologia da ELA	19
1.1.2 Genética da ELA	20
1.2 VARIABILIDADE FENOTÍPICA	23
1.2.1 ELA espinhal	23
1.2.2 ELA bulbar	23
1.2.3 ELA respiratória	23
1.2.4 <i>Flail Arm Syndrome</i>	24
1.2.5 <i>Flail Leg Syndrome</i>	24
1.2.6 Síndrome de Mills	25
1.2.7 ELA familiar	25
1.3 EXAMES COMPLEMENTARES	27
1.4 DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS	28
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	30
<b>3 RELEVÂNCIA SOCIAL</b>	<b>31</b>
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	32
4.2 DELINEAMENTO	32
4.3 LOCAL DO ESTUDO E PERÍODO	32
4.4 CASUÍSTICA	32
4.4.1 Critérios de Seleção da Amostra	32
4.5 DADOS PESQUISADOS	33
4.6 ARMAZENAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	34
4.7 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E NEUROFISIOLÓGICO	35
4.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	37
4.8.1 Descrição da técnica	38
4.8.2 Sequenciamento direto (técnica de Sanger)	39



<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE 1 – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE 2 - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA “AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND FRONTOTEMPORAL DEGENERATION” .....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças do neurônio motor são conhecidas por serem doenças neurológicas progressivas que podem acometer tanto o neurônio motor superior (NMS) quanto o neurônio motor inferior (NMI) de forma independente ou, em alguns casos, concomitante (STATLAND et al., 2015). A classificação desse grupo de doenças depende do local de início dos sintomas, grau de compatibilidade com critérios diagnósticos existentes e padrão de herdabilidade (esporádica ou familiar), além de uma complexa base genética (ARORA; KHAN, 2020).

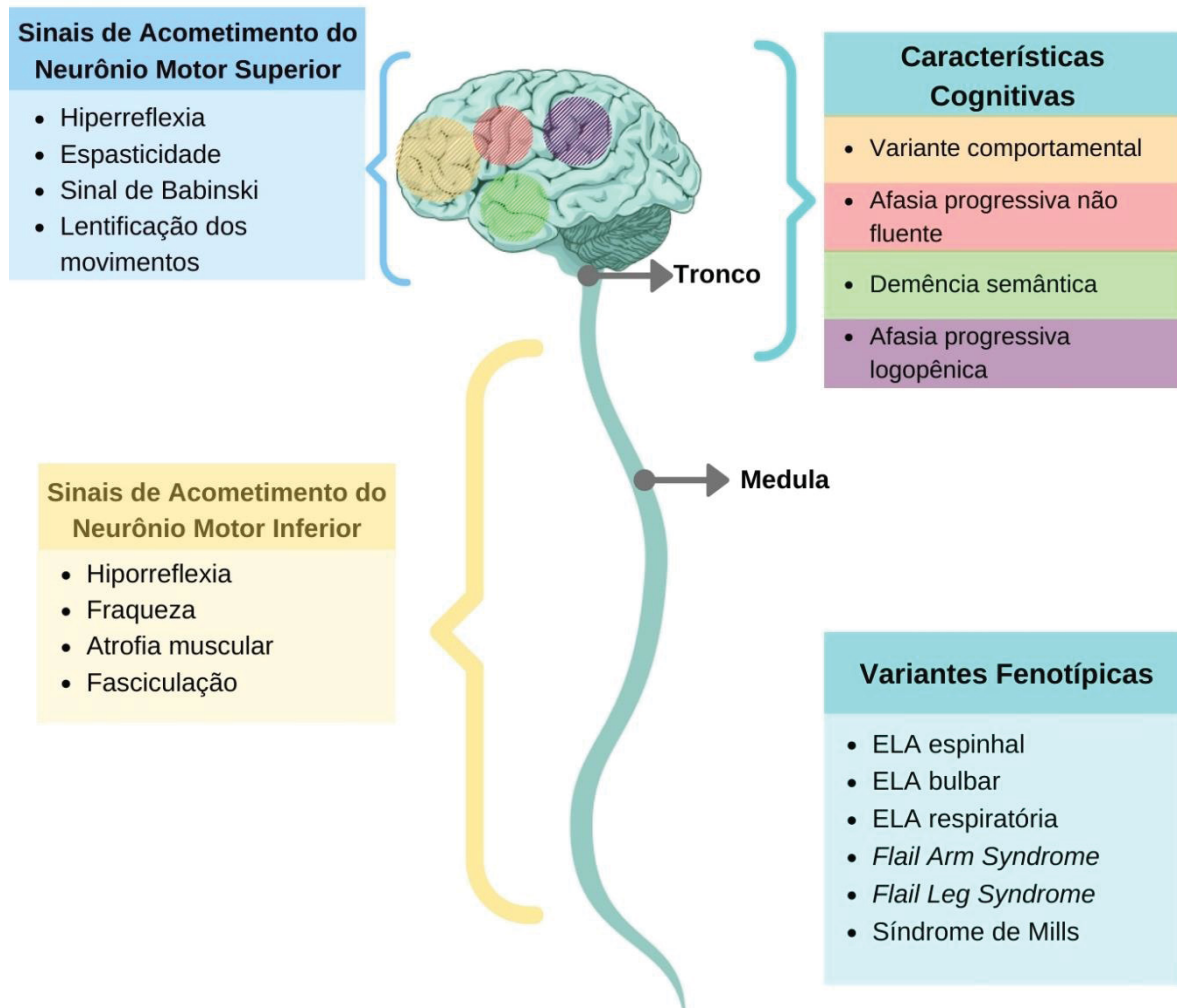
As principais formas de lesão apenas do NMI são Atrofia Muscular Espinhal (AME) e Atrofia Muscular Progressiva (AMP). Danos exclusivamente ao NMS são encontrados na Esclerose Lateral Primária (ELP), enquanto o acometimento de ambos pode ser visto na Esclerose Lateral Amiotrófica (ARORA; KHAN, 2020; STATLAND et al., 2015).

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma paralisia muscular progressiva que reflete a degeneração dos neurônios motores do córtex motor primário, tratos corticoespinhais, tronco encefálico e medula espinhal (ELMAN; MCCLUSKEY, 2016). A doença também está associada a sintomas não motores, incluindo afeto pseudobulbar, apatia, depressão, ansiedade e comprometimento cognitivo (DE ALCÂNTARA et al., 2019). As principais características clínicas da ELA estão resumidas na FIGURA 1.

A ELA foi descrita pela primeira vez em 1869 por Jean-Martin Charcot (KATZ et al., 2015) e, embora rara, sua incidência global parece estar aumentando nos últimos anos, provavelmente decorrente do envelhecimento populacional (MATHIS et al., 2019). Na Europa, sua incidência estimada de cerca de 2-3:100.000 habitantes, enquanto na Ásia é de aproximadamente 0,7:100.000 habitantes (MATHIS et al., 2019), sendo proporcionalmente maior em homens (1.5:1) entre 50 e 65 anos (ZAREI et al., 2015).

No Brasil, ainda não dispomos de dados claros sobre a epidemiologia da doença. Os estudos disponíveis são normalmente relacionados a uma determinada região, como o Paraná (WERNECK et al., 2007), Minas Gerais (PRADO et al., 2016), Porto Alegre (LINDEN JUNIOR et al., 2013) ou com dados nacionais que podem não corresponder aos atuais (DIETRICH-NETO et al., 2000).

FIGURA 1 - Principais características clínicas e variantes fenotípicas da ELA



FONTE: Modificada de Servier Medical Art (SERVIER MEDICAL ART, 2020), conteúdo licenciado por Creative Commons 3.0 Unported License.

A ELA pode ser classificada em dois grandes grupos: esporádica e familiar. Ambas são indistinguíveis clinicamente. ELA esporádica é a mais comum e foi a primeira a ser relatada, ficando conhecida também como “Doença de Charcot”. Ela parece ser responsável por cerca de 90% dos casos da doença; os demais casos são decorrentes da ELA familiar (ZAREI, S. et al., 2015).

A forma familiar começou a ser suspeitada na década de 1950 quando descobriu-se que, na Ilha Guam, havia uma taxa elevada de ELA (50 casos para 25.500 guameses) com vários membros de uma mesma família acometidos (ARNOLD; EDGREN; PALLADINO, 1953). A partir de então, as pesquisas sobre a hereditariedade da doença ganharam força e, alguns anos depois, Kurlan e Mulder identificaram o que chamaram de “ELA familiar com herança dominante” (MATHIS et al., 2019).

Os casos hereditários de ELA podem ser autossômicos dominantes, recessivos ou dominantes ligados ao X. Em sua maioria, a ELA familiar em adultos tem caráter autossômico dominante, enquanto a juvenil (menores de 25 anos) normalmente é recessiva. Nessa forma, também, os sintomas bulbares são muito mais proeminentes que se comparado à ELA esporádica (SOUZA et al., 2015). A descoberta da ELA familiar promoveu avanços também na tentativa de elucidar a sua fisiopatologia.

Em 1993, o *SOD1* (*superoxide dismutase 1*) foi o primeiro gene ligado à ELA familiar descoberto (ROSEN et al., 1993). Em 1995, visando ajudar cientistas e pesquisadores a armazenarem outros genes e variantes encontrados, foi criado o Banco de Dados Online da Esclerose Lateral Amiotrófica, o ALSod (ABEL et al., 2012), que hoje conta com mais de 50 genes e variantes descritos.

Dentre as variantes descritas está a *p.P56S* no gene *VAPB*, também denominada ELA8 (*c.166C>T*; *p.P56S*; *p.Pro56Ser*; 20q13.32; OMIM: #608627) e considerada um subtipo brasileiro de Esclerose Lateral Amiotrófica (NISHIMURA; AL-CHALABI; ZATZ, 2005). Por ser uma forma ainda mais rara, são poucos os dados epidemiológicos disponíveis no mundo e no Brasil (BECCARI, 2016; PRADO et al., 2016), principalmente na região sul do país.

## 1.1 ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

### 1.1.1 Fisiopatologia da ELA

A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma doença heterogênea complexa, cujos mecanismos fisiopatológicos ainda não estão totalmente estabelecidos. Semelhante a outras condições neurodegenerativas, acredita-se que a ELA seja causada por uma combinação de fatores genéticos, ambientais e disfunções relacionadas ao envelhecimento (MASRORI; VAN DAMME, 2020). A interação, ainda não totalmente elucidada, entre esses fatores, parece ser o cerne do seu desenvolvimento (VAN DEN BOS et al., 2019).

Estudos mais recentes sugerem que a disfunção cortical, avaliada através da estimulação magnética transcraniana, pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia da ELA (GEEVASINGA et al., 2016; VAN DEN BOS et al., 2019). Ainda,

já fora proposto por estudos de modelagem que, para o desenvolvimento da ELA, seria necessária a exposição a seis etapas ou fatores consecutivos, até então não identificados (AL-CHALABI et al., 2014).

Sabe-se que inúmeros genes podem estar relacionados à doença. Esses genes atuam através de diferentes mecanismos (FIGURA 2), como alteração da homeostase proteica, metabolismo aberrante do RNA, prejuízo do transporte de vesículas, endossomal e nucleocitoplasmático; axonopatia, disfunção mitocondrial, hiperexcitabilidade e estresse oxidativo, disfunção glial dentre outros (HARDIMAN et al., 2017).

Tantos mecanismos possivelmente envolvidos na doença geram uma variabilidade de apresentação que permite classificá-la em diferentes formas clínicas (SWINNEN; ROBBERECHT, 2014). Isso se deve às diversas possibilidades de acometimento dos neurônios motores e de topografia da lesão (GRAD et al., 2017).

### 1.1.2 Genética da ELA

A arquitetura genética da ELA parece complexa: variantes monogênicas explicam atualmente apenas cerca de 15% dos casos. Ainda, a herdabilidade geral da ELA é alta - em pacientes com a forma esporádica, a herdabilidade é estimada em 30% a 60% (MASRORI; VAN DAMME, 2020). O risco de desenvolver a forma familiar parece dobrar em parentes de primeiro grau de pacientes com ELA (AL-CHALABI et al., 2010).

Desde a descoberta do *SOD1* em 1993, quase três décadas se passaram e mais de 50 genes e *loci* potencialmente causadores ou modificadores da doença já foram registrados ("ALSoD", [s.d.]; MEJZINI et al., 2019). O QUADRO 1 sintetiza os principais tipos de ELA familiar, genes envolvidos e suas características mais relevantes.

Apesar de diversas variantes, as patogênicas mais comuns são as associadas aos genes *SOD1*, *C9ORF72*, *FUS*, *TARDBP* (KIM et al., 2020; MEJZINI et al., 2019). No Brasil, ressalta-se a presença da mutação *missense c.166C>T; p.P56S; p.Pro56Ser*. (BECCARI, 2016; PRADO et al., 2016; TRILICO et al., 2020). Os principais genes e seus mecanismos de ação na fisiopatologia da ELA estão ilustrados na FIGURA 2.

QUADRO 1 - Principais tipos de ELA familiar, genes envolvidos e suas características.

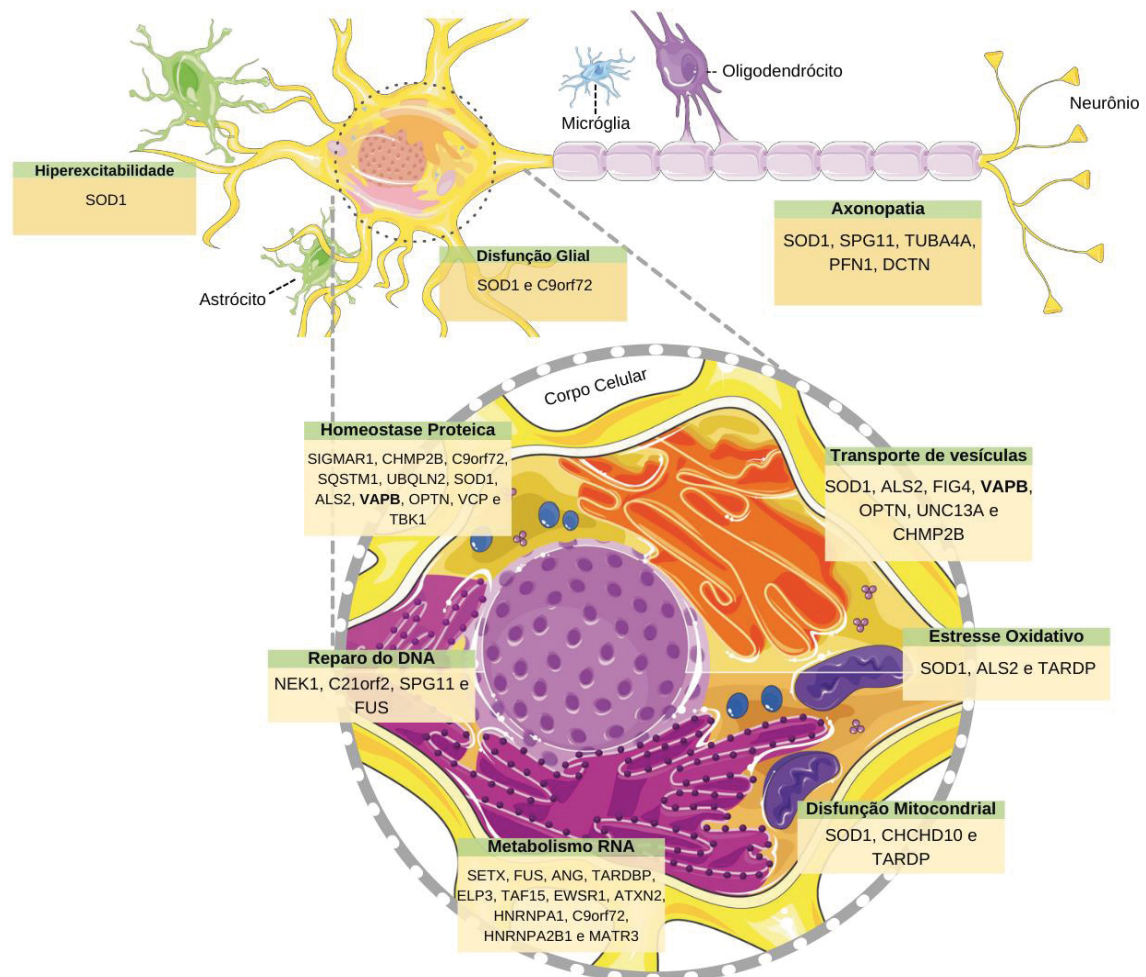
TIPO DE ELA (gene envolvido, lócus)	CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS
ELA1 ( <i>SOD1</i> , 21q22.11)	Sem achados clínicos específicos
ELA2 ( <i>ALS2</i> , 2q33.1)	Juvenil (< 10 anos), AR, NMS, espasticidade facial
ELA3 (18q21)	Sem achados clínicos específicos
ELA4 ( <i>SETX</i> , 9q34.13)	Juvenil (< 20 anos), AD, sem comprometimento bulbar ou respiratório, sinais piramidais semelhantes à Atrofia Muscular Espinhal
ELA5 ( <i>SPG11</i> , 15q21.1)	Juvenil (< 25 anos), AR, progressão lenta
ELA6 ( <i>FUS/TLS</i> , 16p11.2)	Variante juvenil rapidamente progressiva (20-30 anos)
ELA7 (20p13)	Sem achados clínicos específicos
ELA8 ( <i>VAPB</i> , 20q13.32)	Forma brasileira, lentamente progressiva, com tremor postural, acometimento tardio da Atrofia Muscular Espinhal, NMI
ELA9 ( <i>ANG</i> , 14q11.2)	Acometimento bulbar, parkinsonismo, DFT tardia, NMI
ELA10 ( <i>TARDBP</i> , 1p36.22)	Progressão lenta, sem comprometimento cognitivo
ELA11 ( <i>FIG4</i> , 6q21)	AR, sinais piramidais proeminentes
ELA12 ( <i>OPTN</i> , 10p13)	Forma japonesa/italiana, lentamente progressiva, com glaucoma, doença de Paget associada
ELA13 ( <i>ATXN2</i> , 12q24.12)	AEC2, história familiar de parkinsonismo tardio
ELA14 ( <i>VCP</i> , 9p13.3)	Doença de Paget precoce, DFT, miopatia por corpos de inclusão
ELA15 ( <i>UBQLN2</i> , Xp11.21)	Dominância ligada ao X, sintomas bulbares precoces, ELA juvenil, distonia, atetose, acúmulo de ferro cerebral
ELA16 ( <i>SIGMAR1</i> , 9p13.3)	Arábia Saudita, AR, início com paraparesia espástica ou com síndrome de acometimento do neurônio motor inferior; ausência de sintomas bulbares, respiratórios e cognitivos.
ELA17 ( <i>CHMP2B</i> , 3p11.2)	NMI, DFT
ELA18 ( <i>PFN1</i> , 17p13.2)	ELA juvenil, ausência de sintomas bulbares
ELA19 ( <i>ERBB4</i> , 2q34)	Japoneses, acometimento tardio, sem sinais cognitivos
ELA20 ( <i>HNRNPA1</i> , 12q13.13)	Miopatia por corpos de inclusão, doença de Paget precoce, sem sinais cognitivos
ELA21 ( <i>MATR3</i> , 5q31.2)	Paralisia de cordas vocais, miopatia por corpos de inclusão, acometimento cognitivo
DFT-ELA tipo 1 ( <i>C9orf72</i> , 9p21.2)	História familiar complexa, amplo fenótipo neurológico
DFT-ELA tipo 2 ( <i>CHCHD10</i> , 22q11.23)	Franceses e espanhóis, parkinsonismo, acometimento sensitivo, ataxia, miopatia com lesão de fibras vermelhas.
ELA-Parkinsonismo / Demência tipo 1 ( <i>TRPM7</i> , 15q21.2)	Ilha Guam, Parkinsonismo, DFT

FONTE: Adaptado de SOUZA et al., (2015)

AR: autossômico recessivo; AD: autossômico dominante; ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica; DFT: Demência Fronto-temporal; NMS: neurônio motor superior; NMI: neurônio motor inferior; AEC2: Atrofia Espino-Cerebelar tipo 2.



FIGURA 2 – Principais genes e mecanismos envolvidos na fisiopatologia da ELA



FONTE: Modificada de Servier Medical Art (SERVIER MEDICAL ART, 2020), conteúdo licenciado por Creative Commons 3.0 Unported License.

**SOD1:** superoxide dismutase 1; **C9orf72:** chromosome 9 open reading frame 72; **SPG11:** spastic paraplegia 11 gene; **TUBA4A:** tubulin  $\alpha$ 4A; **PFN1:** profilin 1; **DCTN:** dynactin; **SIGMAR1:** sigma non-opioid intracellular receptor 1; **CHMP2B:** charged multivesicular body protein 2B; **SQSTM1:** sequestosome 1; **UBQLN2:** ubiquilin-2; **ALS2:** alsin; **VAPB:** vesicle-associated membrane protein-associated protein B; **OPTN:** optineurin; **VCP:** valosin-containing protein; **TBK1:** TANK-binding kinase 1; **NEK1:** NIMA-related kinase 1; **C21orf2:** chromosome 21 open reading frame 2; **FUS:** fused in sarcoma; **SETX:** senataxin; **ANG:** angiogenin; **ELP3:** encoding elongator complex protein 3; **TAF15:** encoding TATA-binding protein-associated factor 2N; **EWSR1:** encoding RNA-binding protein EWS; **ATXN2:** ataxin 2; **HNRPA1:** heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; **HNRNPA2B1:** heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2-B1; **MATR3:** matrin 3; **CHCHD10:** Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10; **UNC13A:** Unc-13 Homolog A; **TARDBP:** TAR DNA-binding protein 43.

Com os avanços da genética humana nos últimos anos, a busca pelos genes envolvidos na ELA não é mais apenas para determinar sua causa, mas também em busca de um tratamento para essa doença (MEJZINI et al., 2019). Atualmente existem vários ensaios clínicos em andamento para testar terapias que interfiram diretamente nesses genes causadores de Esclerose Lateral Amiotrófica (KIM et al., 2020).

## 1.2 VARIABILIDADE FENOTÍPICA

### 1.2.1 ELA espinhal

Na maioria das vezes, a ELA se manifesta por fraqueza assimétrica nos membros a partir dos 60 anos de idade. O exame clínico normalmente revela uma mistura de achados característicos da lesão dos NMS e NMI: atrofia e fraqueza musculares; fasciculação, hiperreflexia e, em alguns casos, hipertonia (SWINNEN; ROBBERECHT, 2014).

### 1.2.2 ELA bulbar

O primeiro relato da forma bulbar da ELA provavelmente fora descrito por Gombault, aluno de Charcot, em 1871 (GOETZ, 2000). Em cerca de 20% dos pacientes, o quadro se inicia com o acometimento dos músculos bulbares, manifestando-se por disartria, disfagia, flacidez ou espasticidade da língua, bem como sua fasciculação (SWINNEN; ROBBERECHT, 2014). A sobrevida média da ELA bulbar é de dois anos, com prognóstico pior em relação à ela espinhal, provavelmente devido ao risco de pneumonia aspirativa e desnutrição associadas à disfagia (TAKEDA; KITAGAWA; ARAI, 2020).

### 1.2.3 ELA respiratória

Aproximadamente apenas 3% dos casos de ELA cursam, primariamente, com o acometimento do diafragma, o que caracteriza a ELA respiratória (MASRORI; VAN DAMME, 2020). Nela, o dano inicial ocorre nos neurônios motores responsáveis pela inervação da musculatura responsável pela respiração, podendo culminar inclusive com paralisia diafragmática (SRIVALI; RYU; RABATIN, 2016).

Seus sintomas iniciais incluem dispneia aos esforços, dispneia ao repouso e ortopneia, evoluindo precocemente para falência respiratória (NIEDERMEYER; MURN; CHOI, 2019). Em casos ainda mais raros, a doença pode se manifestar inicialmente já com falência respiratória aguda (TATENO et al., 2014).



#### 1.2.4 *Flail Arm Syndrome*

Alguns pacientes têm acometimento do neurônio motor inferior restrito aos membros superiores por pelo menos 12 a 18 meses (TAKEDA; KITAGAWA; ARAI, 2020). Isso torna esses membros, em alguns casos, não funcionantes, enquanto os membros inferiores estão normais. Em outros casos, pode-se ainda haver algum grau de hipertonia e hiperreflexia nos membros inferiores, porém não alterando sua funcionalidade de tal forma que o quadro clínico continua sendo dominado pelos braços; essa variante é a “*Flail Arm Syndrome*” (SWINNEN; ROBBERECHT, 2014), podendo ser também denominada diplegia amiotrófica braquial, síndrome do homem no barril ou síndrome de Vulpian-Bernhardt (MASRORI; VAN DAMME, 2020). Esse subtipo pode representar até 10% dos pacientes com ELA (WIJESEKERA et al., 2009), sendo mais prevalente em homens do que mulheres (4:1) e com sobrevida média de 5-6 anos (TAKEDA; KITAGAWA; ARAI, 2020).

#### 1.2.5 *Flail Leg Syndrome*

Essa síndrome é ainda menos frequente que a “*Flail Arm*” (6% dos pacientes com ELA) e se caracteriza também pelo acometimento do NMI de forma assimétrica e predominantemente distal nos membros inferiores, exclusivamente, por ao menos 12 a 18 meses (TAKEDA; KITAGAWA; ARAI, 2020). Alguns sinais de acometimento do NMS podem surgir no decorrer do tempo, porém não são os que imperam. Em média após 16 meses do início dos sintomas, os membros superiores e a região bulbar também se tornam afetadas (SWINNEN; ROBBERECHT, 2014). Sua progressão normalmente é mais lenta que a variante clássica de ELA e pode se dividir ainda nas formas flácida (pseudo-polineurítica) ou espástica (MASRORI; VAN DAMME, 2020). Recentemente foi descrito o primeiro caso hereditário da variante “*Flail Leg*” em uma família chinesa, ocasionada por uma mutação *missense* no gene *PFN1* (ZOU et al., 2020). Uma mutação *missense* consiste em uma alteração pontual em um par de bases nitrogenadas, resultando em um aminoácido diferente na proteína final codificada (GOOCH, 2011).

### 1.2.6 Síndrome de Mills

O neurologista americano Charles Karsner Mills (1845-1930) descreveu em 1900 (MILLS, 1900) uma variante de doença neuromuscular caracterizada por ser extremamente rara, progressiva, com predominância de neurônio motor superior e com uma característica marcante: hemiparesia ou hemiplegia (BÄUMER et al., 2014; GASTAUT; BARTOLOMEI, 1994). Ainda não há um consenso se a Síndrome de Mill é uma variante da ELA, da esclerose lateral primária, da esclerose múltipla ou mesmo uma entidade distinta (JAISER et al., 2019).

### 1.2.7 ELA familiar

A Esclerose Lateral Amiotrófica Familiar (ELA familiar) pode ser definida quando há mais de um membro da família afetado com parentesco de primeiro ou segundo grau do caso índice e com apresentação clínica igual ou similar, de acordo com a variabilidade clínica intrafamiliar (SOUZA et al., 2015). Aproximadamente 5% a 10% dos casos da doença considerados familiar (MATHIS et al., 2019) e, embora menos comum que a forma esporádica, a ELA familiar tem desempenhado um importante papel em nossa compreensão dos mecanismos fisiopatológicos por meio da descoberta de mutações causadoras dentro das famílias e subsequentes repercussões experimentais desses genes variantes (KIM et al., 2020).

A ELA familiar geralmente está associada a: acometimento precoce, início dos sintomas normalmente nas extremidades inferiores e morbimortalidade, prognóstico e expectativa de vida dependente do subtipo genético a que pertence (SU et al., 2014). Em 2011, foram propostos novos critérios para definir a ELA familiar; todavia, uma pesquisa online internacional, incluindo 21 países em todo o mundo, confirmou que ainda há uma falta de consenso entre os médicos sobre a sua definição e que o teste genético nem sempre é um processo baseado em evidências, além de não ser amplamente disponível entre as diferentes regiões geográficas (MATHIS et al., 2019).

#### 1.2.7.1 ELA familiar tipo 8 (ELA8: OMIN #608627)

Cerne deste estudo, a considerada forma brasileira da ELA, também denominada ELA8, é um subtipo extremamente raro e sem incidência ou prevalência

estimadas até o momento. Em 1962, foram descritos 4 casos de uma família luso-brasileira com um tipo específico de atrofia muscular denominada “forma pseudomiopática progressiva heredo-familiar” (FINKEL, 1962). Quase 20 anos após, em 1981, mais de 80 membros de duas famílias com quadro clínico semelhante foram avaliados e classificados como tendo uma atrofia muscular espinhal lentamente progressiva de início tardio (RICHIERI-COSTA et al., 1981). Membros dessas famílias habitaram pequenos vilarejos no interior do Brasil durante o século XIX (NISHIMURA; AL-CHALABI; ZATZ, 2005).

Em 2004, a análise clínica e genética dessas famílias brasileiras (NISHIMURA et al., 2004) mostraram se tratar de um tipo familiar da Esclerose Lateral Amiotrófica ligada à variante *p.P56S* no gene *VAPB*, exon 2, mapeada no locus 20q13.3 (KANEKURA et al., 2006). Outras mutações no gene *VAPB* causando ELA foram descritas também no Japão, Reino Unido e Holanda (LI, H. F.; WU, Z. Y., 2016).

A sigla VAP origina-se do inglês “*Vesicle-associated membrane protein-associated*” e trata de proteínas de membrana tipo II ligadas ao retículo endoplasmático (RE). Existem três proteínas VAP conhecidas: a VAPA (Proteína A), VAPB (Proteína B) e VAPC (Proteína C), codificadas a partir do *splicing* alternativo do gene *VAPB*, localizado no cromossomo 20 (BECCARI, M. S., 2015).

As VAPs foram descritas como participantes do tráfego intracelular de membranas, do processo de *UPR* (do inglês, *Unfolded Protein Response*), da organização de microtúbulos, mas suas funções mais conhecidas são o transporte de vesículas e metabolismo de lipídeos (LEV et al., 2008; TEULING et al., 2007). Outras funções do *VAPB* têm sido descritas na literatura, incluindo seu envolvimento no controle de qualidade de proteínas pelo retículo endoplasmático, chamado de *Endoplasmic Reticulum Quality Control* ou *ERQC* (MOUSTAQIM-BARRETTE et al., 2013), localização mitocondrial (HAN et al., 2012), homeostase de cálcio (MOROTZ et al., 2012; DE VOS et al., 2012), e proliferação tumoral em câncer de mama (RAO et al., 2012).

Estas funções foram descritas para o *VAPB* devido ao grande interesse na mesma por sua participação conhecida em ELA. Entretanto a alta similaridade entre VAPA e VAPB e sua heterodimerização sugere a possibilidade da atuação da VAPA também nestes mecanismos. A sobreposição de funções entre as duas proteínas ainda é desconhecida (GENEVINI et al., 2019)

As mutações em *VAPB* são responsáveis por diversas formas de ELA, incluindo: ELA rapidamente progressiva em adultos e com dominância de NMI; ELA de progressão lenta com tremores posturais e Atrofia Muscular Espinhal de acometimento tardio tipo Finkel (SOUZA, P. V. S. DE et al, 2015).

A mutação *T46I* foi descrita em um caso de ELA familiar no Reino Unido em 2010 (CHEN et al., 2010), enquanto a mutação *V234I* foi descrita em 2012 em outro paciente holandês com ELA familiar já sabidamente portador da expansão da repetição do hexanucleotídeo GGGGCC no gene *C9ORF72* (VAN BLITTERSWIJK et al., 2012). Entretanto, apesar dessas outras mutações descritas, apenas a *p.P56S* foi relatada em famílias brasileiras com ELA tipo 8 (CHATTOPADHYAY; SENGUPTA, 2014).

A principal hipótese que correlaciona a *VAPB* e a ELA é embasada por diversos estudos, sugerindo-se ser a redução dessa proteína responsável pelo gatilho da doença (BECCARI, M. S., 2015). Acredita-se, portanto, que os pacientes de ELA8 apresentariam quantidades reduzidas da *VAPB* ao longo de seu desenvolvimento e estes níveis se tornam críticos para a sobrevivência dos neurônios motores a partir da 4ª ou 5ª décadas de vida, idade de início dos sintomas (MITNE-NETO et al., 2011).

Os poucos estudos disponíveis sobre a doença sugerem que a ELA8 apresente uma evolução mais lenta do que a forma típica de ELA, com predomínio do acometimento do neurônio motor inferior e início nos membros inferiores (DE ALCÂNTARA et al., 2019). Ainda, acredita-se que a ELA8 possa ter alguns achados clínicos e laboratoriais sugestivos, como dor, tremor, câibras (DI et al., 2016), protrusão abdominal, dislipidemia, comprometimento cognitivo (DE ALCÂNTARA et al., 2019) e neuropatia autonômica (GUO et al., 2020).

### 1.3 EXAMES COMPLEMENTARES

Embora a ELA seja primariamente um diagnóstico clínico, devido à grande variedade de diagnósticos diferenciais, exames complementares podem ser úteis. Nesse caso, os estudos eletroneuromiográficos são uns dos principais aliados. A eletroneuromiografia (ENMG) na Esclerose Lateral Amiotrófica normalmente revela potenciais de fibrilação e descargas espontâneas no músculo em repouso, sugerindo um processo de desinervação (ELMAN, L. B.; MCCLUSKEY, L., 2016).

Quanto aos exames laboratoriais iniciais, os comumente solicitados são VHS, eletroforese de proteínas séricas e urinárias, cálcio e fosfato séricos e, ocasionalmente, análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) (ZAREI, S. et al., 2015). Marcadores mais específicos podem ser necessário para prosseguir a investigação, incluindo testes genéticos, principalmente nos casos familiares (QUADRO 1).

Embora não haja exames de imagem específicos para o diagnóstico de Esclerose Lateral Amiotrófica, a ressonância nuclear magnética de crânio (RNM) é útil principalmente para excluir outras síndromes que possam se assemelhar à ELA (ZAREI, S. et al., 2015). O aumento de sinal nos tratos córtico-espinhais e hipointensidade do córtex motor em T2 na RNM podem estar associados à ELA, embora não sejam patognomônicos (ELMAN, L. B.; MCCLUSKEY, L., 2016).

#### 1.4 DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS

Embora uma avaliação completa aumente a probabilidade do diagnóstico da Esclerose Lateral Amiotrófica, é preciso afastar a possibilidade de que alguns sinais e sintomas estejam presentes também em outras doenças (ELMAN, L. B.; MCCLUSKEY, L., 2016). Assim, o conhecimento de seus diagnósticos diferenciais e dos métodos para discernir entre as várias doenças é fundamental, estando as mais comuns explicitadas no QUADRO 2.

QUADRO 2 - Diagnósticos diferenciais para ELA

DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS	PRINCIPAIS EXAMES AUXILIARES PARA O DIAGNÓSTICO
Miopatia inflamatória	CK
Miopatia distal	CK, biópsia
Distrofia miotônica	Expansão de trinucleotídeos CGC
Doença de Charcot Marie Tooth tipo 2	Genética
Polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica	Líquido cefalorraquidiano, ENMG
Mononeurite múltipla	Glicose, VHS, FAN
Polirradiculopatia infecciosa	Lyme, HIV
Neuropatia motora tóxica	Metal pesado
Deficiência de hexosaminidase	Hexosaminidase
Neuropatia motora multifocal	Anti-GM1, ENMG
Neuropatia motora paraproteinêmica	Imunoelektroforese
Neoplasia (linfoma)	Mielograma
Siringomielia	RNM de coluna
Neurofibromatose central	RNM de crânio
Esclerose múltipla	RNM de crânio
Mielopatia espondilótica	RNM de coluna
Paraparesia espástica pelo HTLV-1	HTLV-1
Deficiência de vitamina B12	Dosagem de vitamina B12 sérica
Mielopatia hipertíroide	TSH
Mielopatia hiperparatíroide	Cálcio, Fósforo, PTH
Encefalomiopatia paraneoplásica	Anti-Hu
Miopatia inflamatória	CK, biópsia
Miastenia grave	anti-RACH
Síndrome de Lambert-Eaton	ENMG
Tumor de forâmen magno	RNM crânio
Esclerose múltipla	RNM crânio
Neuronopatia bulboespinal	Expansão de trinucleotídeo CAG
Mielopatia espondilótica	RNM coluna
Desordens vasculares	RNM cerebral

FONTE: ELMAN, L. B.; MCCLUSKEY, L., 2016.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O estudo tem como objetivo geral avaliar a presença da mutação *p.P56S* no gene *VAPB* relacionada subtipo 8 da esclerose lateral amiotrófica dentre os pacientes com ELA atendidos pelo serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Sendo os pacientes com ELA portadores da mutação *p.P56S*, eles foram submetidos à avaliação clínica, laboratorial e neurofisiológica, comparando seus achados com os dos demais pacientes com ELA não portadores dessa mutação.

### 3 RELEVÂNCIA SOCIAL

A incidência de ELA na Europa e América do Norte está entre 1,5 e 2,7 por 100.000 pessoas/ano, enquanto a prevalência chega a 7,4:100.000, sendo proporcionalmente maior em homens (1.5:1) entre 50 e 65 anos e com mortalidade em torno de 3 anos (MARAGAKIS; GALVEZ-JIMENES, 2020). No Brasil, faltam dados atualizados e precisos, mas estima-se que a idade média de acometimento esteja em 52 anos; a epidemiologia das demais doenças do neurônio motor inferior no país é ainda mais escassa (DIETRICH-NETO et al., 2000; FGA; DE LIMA; ALVARENGA, 2009; LINDEN JUNIOR et al., 2013; PRADO et al., 2016; WERNECK et al., 2007).

A etiologia da ELA e seus fatores de risco também não estão bem estabelecidos. Diversos mecanismos fisiopatológicos foram propostos e acredita-se ser idade e história familiar os principais fatores de risco (MARAGAKIS; GALVEZ-JIMENES, 2020). Atualmente, com o advento da tecnologia e da genética, diversos genes estão sendo associados a ELA e a outras doenças do neurônio motor inferior. Tal fato tem possibilitado compreender melhor essas doenças, diferenciar suas formas clínicas e orientar precocemente os pacientes e seus familiares.

A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma doença grave, sem tratamento específico e cujo prognóstico está relacionado ao diagnóstico e intervenção precoce, ofertando a esses pacientes e seus familiares orientação adequada e atendimento multidisciplinar especializado (MARAGAKIS; GALVEZ-JIMENES, 2020). Para tal, são necessários mais estudos sobre a ELA, como propõe esse projeto.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), parecer número 2.426.784, e registrado sob o CAAE 80180117.0.0000.0096, e está em acordo com os princípios da Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 2013). Os participantes assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após explicação detalhada.

### 4.2 DELINEAMENTO

Estudo descritivo, observacional, transversal, único-cêntrico, de amostra não-probabilística por conveniência.

### 4.3 LOCAL DO ESTUDO E PERÍODO

O estudo foi conduzido no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) entre 2017 e 2019 com os pacientes atendidos pelo Serviço de Doenças Neuromusculares do mesmo hospital entre 2004 e 2018. Os exames moleculares foram realizados no laboratório de biologia molecular do Serviço de Doenças Neuromusculares do CHC-UFPR.

### 4.4 CASUÍSTICA

#### 4.4.1 Critérios de Seleção da Amostra

Foram identificados 71 pacientes catalogados como portadores predominantemente de acometimento do neurônio motor inferior na base de dados do Serviço de Doenças Neuromusculares do CHC-UFPR e avaliados para elegibilidade de acordo com critérios de inclusão e exclusão.

#### 4.4.1.1 Critérios de Inclusão

- a) Diagnóstico de ELA definido ou provável de acordo com os critérios de Awaji (DE CARVALHO et al., 2008);
- b) Material biológico disponível para análise.

#### 4.4.1.2 Critérios de Exclusão

- a) Diagnóstico de qualquer outra doença neuromuscular;
- b) Familiares de pacientes com doença neuromuscular;
- c) Familiares de pacientes com ELA;
- d) Idade inferior a 14 anos;

### 4.5 DADOS PESQUISADOS

Foram revisados os prontuários e coletados os dados pertinentes conforme o protocolo de coleta de dados presentes no APÊNDICE 1, tendo como base os achados pertinentes do QUADRO 3. Avaliaram-se aspectos clínicos, neurofisiológicos, exames complementares e registro de material biológico coletado previamente (GRÁFICO 1).

Os pacientes com diagnóstico clínico e neurofisiológico de ELA, conforme descrito na seção 4.7, com material biológico disponível tiveram o mesmo testado para a mutação *p.P56S* do gene *VAPB*, utilizando-se protocolo específico. Os pacientes com teste genético positivo para a referida mutação foram convocados para nova avaliação clínica presencial.

Na avaliação presencial, foram revisados e atualizados os dados desses pacientes, além de fotografados achados físicos relevantes após assinatura de termo de consentimento para foto e vídeo.

QUADRO 3 - Principais achados na forma VAPB da ELA.

CLÍNICA	OBSERVAÇÕES
Tremor	Extremidades de MMSS, baixa amplitude, ausente ao repouso
Dor no membro afetado	-
Dor em cintura pélvica	Com fraqueza proximal de MMII
Lombalgia	-
Lordose Lombar	-
Fasciculação	-
Cãibra	Ao movimento, repouso ou sono
Disfunção autonômica	Constipação, tosse, engasgos, ereção prolongada, anidrose
Fraqueza muscular	Axo-rizomélica, próximo-axial, abdutores e rotadores laterais dos ombros, flexores e abdutores dos quadris e reto abdominais.
Protrusão abdominal	Por fraqueza dos músculos reto-abdominais, com aumento do volume abdominal.
Reflexos tendinosos profundos	Hiperreflexia, hiporreflexia ou arreflexia.
Distúrbio lipídico	Aumento do colesterol total e diminuição do HDL
Início tardio	Quarta década de vida
EXAMES COMPLEMENTARES	OBSERVAÇÕES
Eletroneuromiografia	Rarefação do número de unidades motoras predominando em localização proximal; potenciais de unidade motora com aumento de duração e amplitude, morfologia polifásica e estável. Frequência de descarga aumentada.
Ressonância Nuclear Magnética	-

FONTE: O autor (2020).

#### 4.6 ARMAZENAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados coletados foram armazenados eletronicamente conforme Resolução CFM Nº 1.821/2007 (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2007) e a Resolução CFM Nº 2.218/2018 (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2018), sendo assegurada a proteção aos dados pessoais dos participantes conforme legislação em vigor (BRASIL, 2018).

Para análise dos dados foram utilizados os programas *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows, versão 24.0, e Microsoft Excel para Microsoft 365 versão 1909 (*Build 12026.20344*). As análises estatísticas descritivas foram feitas através do cálculo de medidas-resumo relevantes ao estudo (média, mediana e desvio padrão), levando-se em consideração a natureza das variáveis envolvidas e o tamanho amostral.

#### 4.7 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E NEUROFISIOLÓGICO

Para o diagnóstico, foram utilizados os critérios de Awaji, aceitos pela “*World Federation of Neurology*”. Propostos em 2008, os critérios de Awaji se diferenciam dos demais principalmente por incluir a possibilidade do diagnóstico eletroneuromiográfico na presença de potenciais de fibrilação e ondas agudas positivas (DE CARVALHO et al., 2008). Com isso, eles possibilitam o diagnóstico precoce da ELA com subsídio neurofisiológico (COSTA; SWASH; M, 2012), permitindo classificar os pacientes em ELA possível, ELA provável e ELA definida, conforme o QUADRO 4.

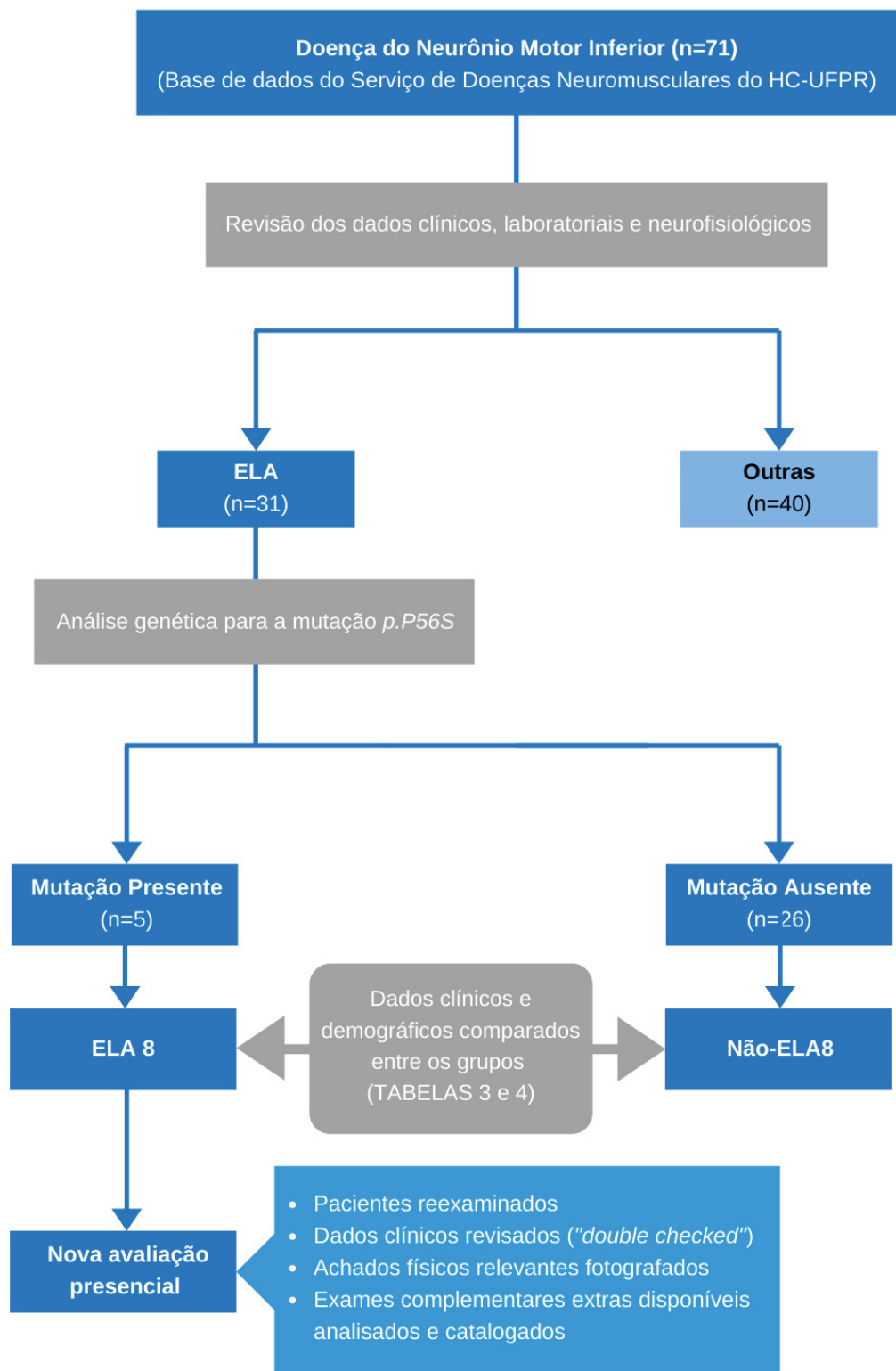
QUADRO 4 - Critérios de Awaji para ELA

POSSÍVEL	PROVÁVEL	DEFINIDO
Evidência clínica ou por ENMG de acometimento de NMI e NMS em apenas 1 região <b>ou</b> apenas de NMS em 2 ou mais regiões; <b>ou</b> sinais de NMI rostrais aos de NMS.	Evidência clínica ou por ENMG de acometimento de NMS e NMI em região bulbar <b>e</b> , no mínimo, 2 regiões espinais; <b>ou</b> acometimento de NMS e NMI em 3 regiões espinais com os sinais de NMS necessariamente rostrais aos de NMI.	Evidência clínica ou por ENMG de acometimento de NMS e NMI em região bulbar <b>e</b> , no mínimo, 2 regiões espinais; <b>ou</b> acometimento de NMS e NMI em 3 regiões espinais

FONTE: COSTA; SWASH; M, (2012).

Regiões: bulbar, cervical, torácica, lombar; ENMG: eletroneuromiografia; NMS: neurônio motor superior; NMI: neurônio motor inferior.

GRÁFICO 1 – Fluxograma da metodologia do estudo.



Fonte: O autor (2020).

ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica, ELA8: Esclerose Lateral Amiotrófica tipo 8

## 4.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

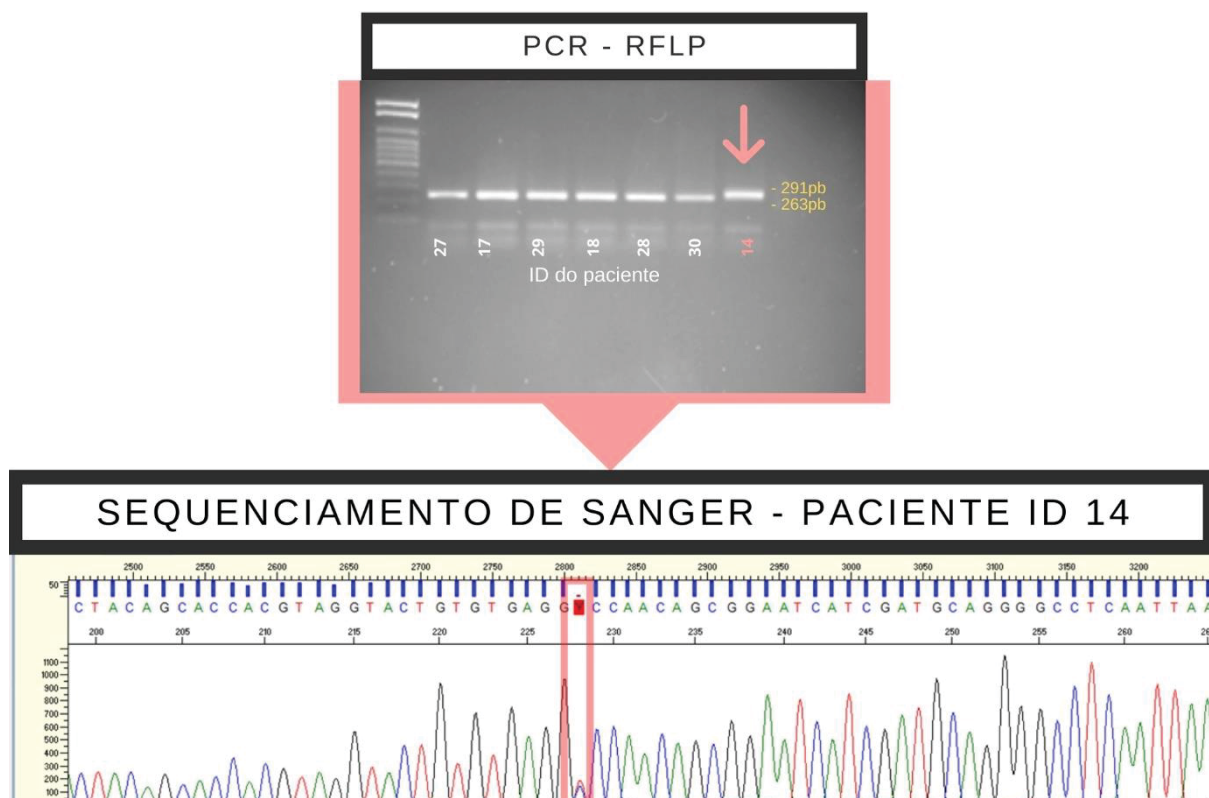
Amostras de sangue foram coletadas de veias periféricas em tubos de vácuo revestidos com EDTA. O DNA foi extraído dos linfócitos do sangue periférico usando um método modificado de fenol / clorofórmio. O gene *VAPB* foi inicialmente analisado por reação em cadeia da polimerase com polimorfismo baseado no comprimento do fragmento de restrição, PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e sequenciamento de Sanger.

Inicialmente, o DNA foi analisado por PCR-RFLP para detectar uma mutação ponto patogênica devido a uma transição **C**→T no nucleotídeo 166 do exon 2 no gene *VAPB* (*c.166C>T*; *p.P56S*; *p.Pro56Ser*), de acordo com o método descrito previamente (PRADO et al., 2016). Se o paciente era heterozigoto para a mutação *p.P56S*, a ELA8 foi confirmada (FIGURA 3).

Nos pacientes para os quais a PCR-RFLP detectou a referida mutação patogênica, o sequenciamento pela técnica de Sanger foi realizado adicionalmente apenas no exon 2, para analisar a mutação *p.P56S*. O sequenciamento foi realizado usando um kit de sequenciamento de ciclo *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems) e um analisador genético modelo 3130 *Genetic Analyser Life Technologies*. As sequências obtidas foram comparadas com a referência genômica revisada do gene *VAPB* (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2020).

Após a identificação da variante *VAPB*, os pacientes foram reexaminados e seus dados clínicos revisados ('verificados duas vezes'). Os pacientes foram então agrupados de acordo com o status genético: ELA8 (ELA associada à mutação *p.P56S*) e não-ELA8 (ELA sem associação à mutação *p.P56S*). Os achados clínicos foram comparados entre os grupos.

FIGURA 3 - Exemplo de PCR-RFLP e sequenciamento pela técnica de Sanger no paciente ID 14.



FONTE: O autor (2020).

Material após ação da enzima BshF I (*Hae III*) evidenciando banda de DNA do paciente ID 14 do tamanho de 291pb, que confirma a heterozigose para a mutação *p.P56S*.

PCR-RFLP: *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*; ID: Código de identificação exclusivo do paciente em nosso banco de dados; PB: Pares de bases.

#### 4.8.1 Descrição da técnica

As amostras foram submetidas a técnica de PCR. Para cada reação de PCR é preparada uma solução de 30 microlitros, contendo água ultrapura, tampão 10X, cloreto de magnésio 50mM, dNTPs 2,5mM, Primer F (forward) e R (reverse), TAq Platinum Invitrogen®, enzima de restrição BshF I (*Hae III*) e 1,00 microlitro de DNA. O programa utilizado no termociclador foi de 94°C por 3 minutos para desnaturação e abertura da dupla fita de DNA seguidos por 34 ciclos a 94°C por 40 segundos / 60°C por 40 segundos / 72°C por 40 segundos e, por último, a 72°C por 10 minutos.

Para amplificação do éxon 2, responsável pela ELA8, foram utilizados os seguintes *primers*: FORWARD: 5' GCATTAACCTCAGCTCATCT 3' e o REVERSE: 5' GGGTGGAGAGAATTCTATCA 3'.

A eletroforese é realizada em gel de agarose a 1%. Para cada 100 ml de gel utiliza-se 1,0 grama de agarose. Adiciona-se ao composto 100ml de tampão TBE 1X

e funde-se a solução em micro-ondas até sua homogeneização. Após seu resfriamento, acrescenta-se 5µl de SYBer® Safe DNA e mistura-se levemente a amostra até sua homogeneização.

Após homogeneizada, espera-se a solução solidificar e adiciona-se tampão TBE 1X até cobrir a superfície do gel. Para a aplicação da PCR, retira-se a quantidade desejada da amostra (2 a 5µL), homogeneiza-a com o volume desejado de Stop Solution (1 a 5µL) e se aplica padrão de corrida com voltagem ajustada de acordo com o tempo de corrida desejada. Ao final, o gel é analisado no Transiluminador Invitrogen®.

A análise do gel é realizada comparando os perfis, com controle positivo e um negativo. Quando o perfil dá um resultado duvidoso, faz-se necessário realizar o sequenciamento dos genes.

#### 4.8.2 Sequenciamento direto (técnica de Sanger)

Trata-se de uma série de métodos bioquímicos que têm como finalidade determinar a ordem das bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) da molécula de DNA. A caracterização completa de um fragmento de DNA clonado implica a determinação da sua sequência de nucleotídeos. Para este fim usa-se normalmente a técnica de Sanger, o qual permite determinar a sequência exata de uma cadeia de DNA. Para o sequenciamento serão realizadas as seguintes etapas:

- a) nova amplificação do PCR;
- b) correr um gel de agarose para verificar se a amplificação foi positiva.

Se a amplificação for positiva a próxima etapa é purificar a PCR. O objetivo desta etapa é a eliminação de primers não hibridizados, desoxi-nucleotídeos (dNTPs) não utilizados e resíduos de DNA de fita simples que possam ter sobrado ou se originado na reação de amplificação anterior, dado que a presença destes elementos residuais compromete a análise do sequenciamento.

Para isto, os produtos de PCR obtidos foram purificados através do método enzimático utilizando as enzimas Exonuclease I (EXO I) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP; do inglês: *Shrimp Alkaline Phosphatase*) da USB Corporation. Esse método consiste na atividade nuclease da EXO I em degradar oligonucleotídeos simples fita e na atividade da SAP de desfosforilar nucleotídeos trifosfatos (dNTPs)



não incorporados durante a reação de PCR. Essas enzimas têm atividade ótima na temperatura de 37°C e são desnaturadas a temperatura superior a 65°C por um tempo de 15 minutos. O programa no termociclador é de 37°C por 20 minutos seguido de 80°C por 20 minutos.

Finalizada a reação de sequenciamento em que, a partir do anelamento do primer, os nucleotídeos são incorporados de acordo com a fita molde, ocorrem tanto a incorporação dos nucleotídeos livres não marcados, quanto dos nucleotídeos marcados terminadores com fluorescência, onde cada tipo de nucleotídeo recebe uma fluorescência de cor diferente (por exemplo: T, A, C, G). Os nucleotídeos marcados são denominados de “nucleotídeos terminadores”, pois sua incorporação determina a finalização do alongamento da dupla fita. No final da reação são gerados fragmentos de vários tamanhos diferentes e, conseqüentemente, também sobra de primers, ddNTPs, dNTPs, alguns sais dentre outros reagentes. Sendo assim, faz-se necessário o próximo passo de precipitação. O protocolo para a PCR linear utiliza os reagentes descritos na TABELA 1 - Reagentes e volumes para PCR linear.

TABELA 1 - Reagentes e volumes para PCR linear

Reagentes	Volume/Quantidade
BigDye 3.1	8µl
Produto de PCR purificado	2µl
Primers F ou R	3,2pmol
Sequencing Buffer	4 µl
Água (18,2MΩcm)	q.s.p. 20µl

FONTE: O autor (2020).

O programa no termociclador segue as etapas: 1) Inicial: 96°C por 1 minuto; 2) Desnaturação: 96°C por 15 segundos; 3) Hibridização: 50°C por 30 segundos; 4) Extensão: 60°C por 2 minutos, totalizando 25 ciclos e 5) Final: resfriamento a 4-8°C.

Após a realização da PCR Linear, é feita sua purificação para eliminar ddNTPs não incorporadas e os sais presentes. No método de purificação utilizado, adiciona-se acetato de sódio e etanol absoluto para precipitar o DNA. Depois, realiza a separação por centrifugação, secando bem a amostra, uma vez que o etanol pode dar picos extras no eletroferograma, atrapalhando a análise. Adiciona-se na amostra Formamida Hi-Di® e se leva o conteúdo ao termociclador por 3 minutos a 95°C para

desnaturar. O produto final é levado ao sequenciador 3130 *Genetic Analyser Life Technologies* para correr com Polímero POP6.

## 5 RESULTADOS

Foram avaliados 71 casos catalogados como doenças do neurônio motor e que possuíam material genético disponível entre 2004 e 2018 no serviço de Neurologia e Doenças Neuromusculares. Desses, 31 correspondiam à Esclerose Lateral Amiotrófica, com diagnóstico clínico e eletroneuromiográfico. Esses pacientes foram avaliados geneticamente para a mutação no gene *VAPB*, estando a mesma presente em cinco deles conforme a TABELA 2.

TABELA 2 - Distribuição dos casos catalogados como doença do neurônio motor e com material genético disponível no período de 2004 a 2018.

DOENÇA	NÚMERO DE CASOS
ELA (NÃO <i>VAPB</i> )	26
ELA ( <i>VAPB</i> )	5
AMP	1
AME	26
OUTRAS	13
<b>TOTAL:</b>	<b>71</b>

FONTE: O autor (2020).

ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica, *VAPB*: *Vesicle-associated membrane protein-associated protein B*, AMP: Atrofia Muscular Progressiva, AME: Atrofia Muscular Espinhal.

Os pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica confirmada (n=31) foram então separados em dois grupos: ELA8 e não-ELA8, tendo suas características clínicas e demográficas resumidas na TABELA 3.

A mutação *p.P56S* associada à ELA8 foi detectada em cinco pacientes (2 homens e 3 mulheres) de famílias não relacionadas (faixa etária de 45 a 63 anos; mediana de 54 anos; média de  $55 \pm 7,5$  anos). A análise molecular para a mesma mutação não revelou sua presença em 26 pacientes (14 homens e 12 mulheres) de famílias não relacionadas (faixa etária de 37 a 76 anos; mediana de 59,5 anos; média de  $56,9 \pm 11,5$  anos).

TABELA 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com ELA

	ELA8 (n=5)	Não-ELA8 (n=26)	Total
<b>Gênero</b>			
Masculino	2	14	16
Feminino	3	12	15
<b>Idade (anos)</b>			
Mínima	45	37	
Máxima	63	76	
Média ( $\pm$ DP)	55 ( $\pm$ 7,5)	56,9 ( $\pm$ 11,5)	
<b>Idade de início dos sintomas (anos)</b>			
Mínima	40	24	
Máxima	51	67	
Média ( $\pm$ DP)	45 ( $\pm$ 5,3)	47,6 ( $\pm$ 13,1)	
<b>Tempo de doença* (anos)</b>			
Mínimo	3	1	
Máximo	20	22	
Médio ( $\pm$ DP)	10,4 ( $\pm$ 6,7)	7,7 ( $\pm$ 6,1)	
<b>História Familiar</b>			
Sim	5	7	
Não	0	19	

FONTE: O autor (2020).

ELA8: Esclerose Lateral Amiotrófica tipo 8;  $\pm$ DP: Desvio Padrão; \*: desde o início dos sintomas.

A idade média de início dos sintomas foi de  $45 \pm 5,3$  anos (mediana 43 anos) para o grupo ELA8 e  $47,6 \pm 13,1$  anos (mediana de 46 anos) para o grupo não-ELA8. O tempo entre o início dos sintomas e o último acompanhamento foi maior nos pacientes com ELA8 ( $10,4 \pm 6,7$  anos) que nos pacientes não-ELA8 ( $7,7 \pm 6,1$  anos). História de familiares afetados foram relatados em ambos os grupos. Entretanto, dentre os pacientes ELA8, todos (100%) relataram algum familiar afetado. Já no grupo não-ELA8, apenas sete pacientes (26%) informaram história de familiares com sintomas semelhantes.

A TABELA 4 compara os achados clínicos característicos da ELA8 entre os dois grupos. Observou-se maior percentual de tremor (60%), dor no membro afetado

(80%), cãibras (100%) e protrusão abdominal (100%) (FIGURA 4) nos pacientes ELA8. No grupo não-ELA8, excetuando-se a dor (53,8%), a maioria não apresentou tais achados e a protrusão abdominal estava presente em apenas um paciente (3,8%).

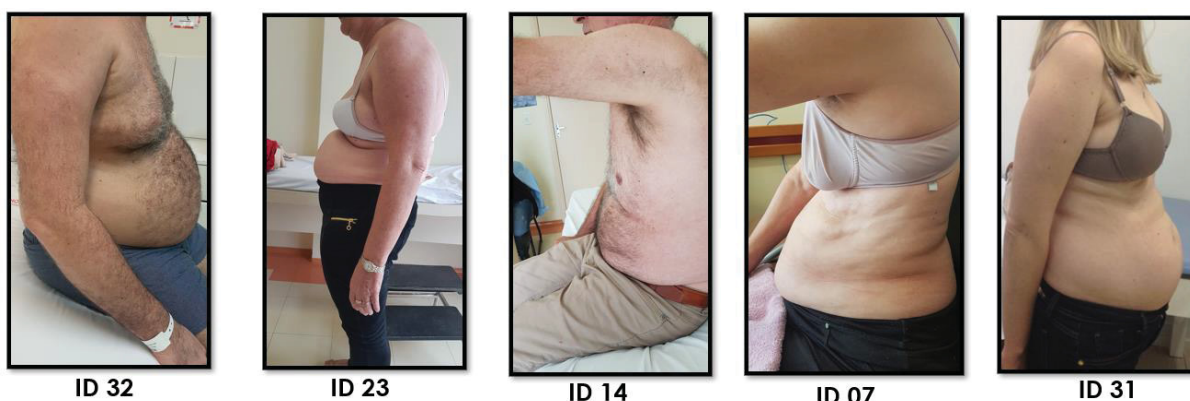
TABELA 4 – Principais achados clínicos característicos da ELA8.

	ELA8 (n=5)		Não-ELA8 (n=26)	
	SIM (%)	NÃO (%)	SIM (%)	NÃO (%)
<b>Tremor</b>	3 (60%)	2 (40%)	3 (11,5%)	23 (88,4%)
<b>Dor no membro afetado</b>	4 (80%)	1 (20%)	14 (53,8%)	12 (46,2%)
<b>Cãibras</b>	5 (100%)	0 (0%)	10 (38,4%)	16 (61,5%)
<b>Protrusão abdominal</b>	5 (100%)	0 (0%)	1 (3,8%)	25 (96,1%)

FONTE: O autor (2020).

ELA8: Esclerose Lateral Amiotrófica tipo 8.

FIGURA 4 - Protrusão abdominal nos pacientes ELA8



FONTE: O autor (2020).

ID: Código de identificação exclusivo do paciente em nosso banco de dados.

Todos os pacientes com ELA8 relataram que os sintomas começaram nos membros inferiores. O acometimento motor de quatro desses pacientes (80%) era predominantemente compatível com lesão de neurônio motor inferior, conforme ilustrado na TABELA 5, que também mostra os principais achados clínicos individualizados em cada paciente com a mutação *p.P56S*.

A TABELA 6 resume os principais achados do estudo de condução nervosa motora e ondas F em membros inferiores dos pacientes ELA8. No momento dos exames, todos os pacientes apresentavam resultados considerados normais para os parâmetros avaliados.

TABELA 5 – Principais achados clínicos individualizados nos pacientes ELA8.

ID	Gênero	Idade de início (anos)	Tempo de doença (anos)	Local de início	NMp	Tremor	Cãibras	PA
07	F	40	21+	Espinhal (MI/BI)	NMI	Sim	Sim	Sim
14	M	48	15+	Espinhal (MI/BI)	NMI	Sim	Sim	Sim
23	F	41	6+	Espinhal (MI/UN)	NMI	Sim	Sim	Sim
31	F	43	10+	Espinhal (MI/BI)	NMI	Não	Sim	Sim
32	M	51	3+	Espinhal (MI/UN)	Não	Não	Sim	Sim

FONTE: O autor (2020).

ID: código de identificação exclusivo do paciente em nosso banco de dados.

F: feminino; M: masculino; MI: membro inferior; MS: membro superior; UN: unilateral; BI: bilateral;

NMp: neurônio motor predominante; Não: ausência de predominância ou do sintoma. NMI: neurônio motor inferior; +: paciente vivo atualmente; PA: protrusão abdominal

TABELA 6 – Principais achados do estudo de condução nervosa nos pacientes ELA8 estudados.

	Absoluto	Nervo Fibular Comum		Nervo Tibial Posterior		
		Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Latência Motora Distal						
Normal	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	
Anormal	0	0	0	0	0	
Amplitude PAMC						
Normal	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	
Anormal	0	0	0	0	0	
Velocidade de Condução Motora						
Normal	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	
Anormal	0	0	0	0	0	
Latência da onda F						
Normal	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	
Anormal	0	0	0	0	0	

Fonte: O autor (2020).

n: número de pacientes com o referido achado; (%): percentual de pacientes com o referido achado dentre o total de pacientes ELA8; PAMC: potencial de ação muscular composto.

O resultado da análise do exame de eletromiografia de agulha nos quatro segmentos corporais (bulbar, cervical, torácico e lombossacro) dos pacientes ELA8 para denervação ativa, denervação crônica e potenciais de fasciculação estão sintetizados na TABELA 7. Um dos pacientes (ID 31) possuía apenas a conclusão final do laudo da eletroneuromiografia disponível no prontuário, sem acesso aos detalhes da mesma.

Todos os pacientes apresentavam sinais de denervação em no mínimo três segmentos. Excetuando-se o paciente 31, todos os demais apresentavam comprometimento do segmento lombossacro e, apenas 1, do segmento bulbar.

TABELA 7 – Principais achados da eletromiografia de agulha nos pacientes ELA8 estudados.

PACIENTE ID	DENERVAÇÃO ATIVA		DENERVAÇÃO CRÔNICA		POTENCIAIS DE FASCICULAÇÃO
	Segmentos	Músculos n (T)	Segmentos	Músculos n (T)	
7	BULBAR	0 (1)	BULBAR	NR	NÃO
	CERVICAL	3 (6)	CERVICAL	6 (6)	SIM
	TORÁCICO	1 (1)	TORÁCICO	NR	SIM
	LOMBOSSACRO	1 (4)	LOMBOSSACRO	3 (4)	SIM
14	BULBAR	0 (1)	BULBAR	NR	NÃO
	CERVICAL	3 (5)	CERVICAL	5 (5)	SIM
	TORÁCICO	1 (1)	TORÁCICO	NR	SIM
	LOMBOSSACRO	4 (7)	LOMBOSSACRO	6 (7)	SIM
23	BULBAR	1 (1)	BULBAR	NR	NÃO
	CERVICAL	2 (10)	CERVICAL	10 (10)	SIM
	TORÁCICO	NR	TORÁCICO	NR	NR
	LOMBOSSACRO	3 (5)	LOMBOSSACRO	2 (5)	SIM
31	Sinais de denervação e reinervação em três segmentos*				
32	BULBAR	0 (1)	BULBAR	NR	NÃO
	CERVICAL	3 (8)	CERVICAL	4 (7)	NÃO
	TORÁCICO	1 (1)	TORÁCICO	NR	NÃO
	LOMBOSSACRO	5 (8)	LOMBOSSACRO	8 (8)	NÃO

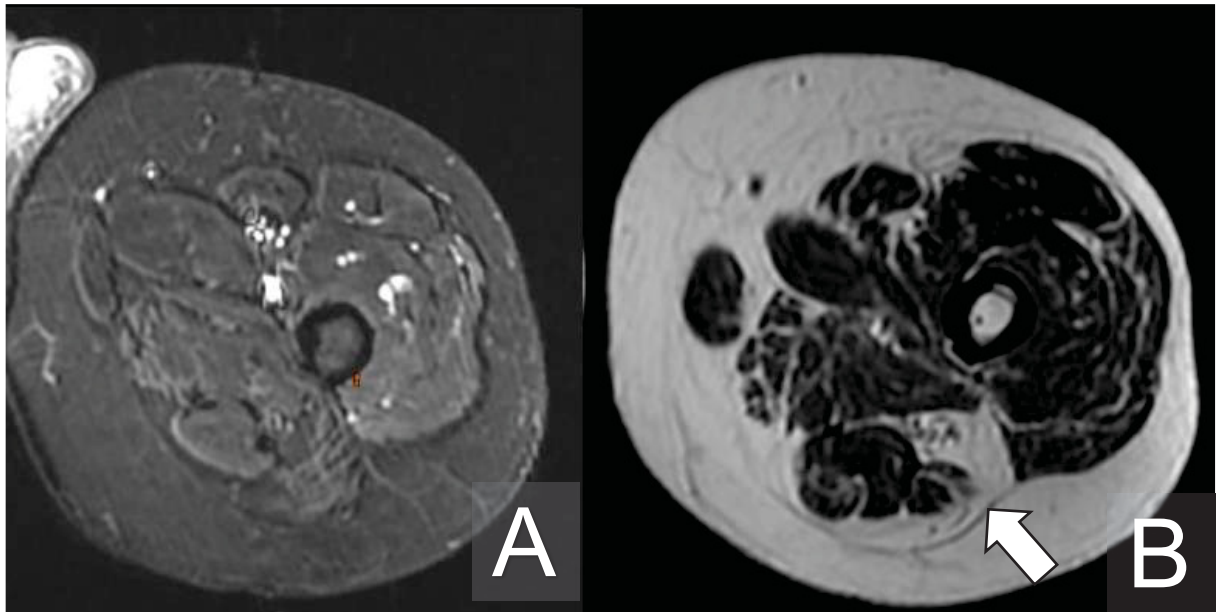
Fonte: O autor (2020).

ID: código de identificação exclusivo do paciente em nosso banco de dados; n: número de músculos acometidos; T: total de músculos testados no respectivo segmento; NR: não realizado.

\* Apenas a conclusão final do laudo da eletroneuromiografia deste paciente estava disponível.

O paciente 32 foi submetido à ressonância magnética para avaliação muscular de sua coxa esquerda (FIGURA 5).

FIGURA 5 – Ressonância Magnética de coxa esquerda do paciente ID 32.



Fonte: O autor, (2020).

A: sequência pesada T2 com supressão de gordura (ou STIR); B: sequência pesada em T1. Seta indicando um dos pontos cuja alteração de sinal na ressonância é compatível com lipossustituição da musculatura.



## 6 DISCUSSÃO

A ELA8 é um importante subtipo genético da esclerose lateral amiotrófica no Brasil. Todavia, existem poucos estudos sobre subtipos da ELA, incluindo o subtipo 8, em nosso país. Estudos da doença publicados anteriormente no Brasil eram focados na região sudeste, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo (PRADO et al., 2016). Embora estudos prévios sobre ELA tenha sido realizado no sul do Brasil (LINDEN JUNIOR et al., 2013; WERNECK et al., 2007), esta é a maior série de famílias não relacionadas entre si com ELA8 relatadas nessa região do país (TRILICO et al., 2020).

A mutação *p.P56S* no gene *VAPB* é considerada precursora comum da ELA8 na população brasileira e provavelmente associada à colonização portuguesa (NISHIMURA; AL-CHALABI; ZATZ, 2005). Estudos prévios de pacientes brasileiros encontraram a mesma mutação como uma variante comum associada à ELA8 (ALCÂNTARA et al., 2019; BECCARI, 2016; PRADO et al., 2016). Portanto, é recomendável rastrear a mutação *p.P56S* quando houver suspeita clínica da mesma.

Em nossa população estudada, o acometimento pela ELA foi maior em homens do que em mulheres no grupo não-ELA8, o que é condizente com estudos epidemiológicos prévios (TALBOTT; MALEK; LACOMIS, 2016; VAN ES et al., 2017). Já em nosso grupo de pacientes ELA8, a presença da mutação foi maior em mulheres do que em homens, diferente do relatado na literatura (ALCÂNTARA et al., 2019), o que pode ser devido ao número pequeno de participantes com ELA8 deste estudo.

A idade média do início dos sintomas na ELA8 na população aqui estudada ( $45 \pm 5,3$  anos) foi consistente descrições e estudos publicados anteriormente (YAMASHITA; ANDO, 2015). Isso provavelmente se deve aos níveis reduzidos de VAPB, que se tornam críticos para a sobrevivência de neurônios motores entre a quarta e quinta décadas de vida (MITNE-NETO et al., 2011), iniciando o quadro clínico da doença. No entanto, a idade de início dos sintomas no grupo não-ELA8 ( $47,6 \pm 13,1$  anos) foi menor do que o relatado em outros estudos (MARIN et al., 2016; TALBOTT; MALEK; LACOMIS, 2016), provavelmente devido à presença de pacientes com outras formas familiares que não a variante analisada neste estudo.

A sobrevida do grupo não-ALS8 foi maior do que o descrito em outros estudos (RIVA et al., 2016; SHAHRIZAILA et al., 2016). Isso pode ser devido à presença de

pacientes com outras variantes lentamente progressivas, como a “*Flail Arm*” (SALAMEH; BROWN; BERRY, 2015; VAN ES et al., 2017) em nosso grupo.

Este estudo buscou alterações clínicas comuns em pessoas acometidas por ELA8, tendo os nossos pacientes apresentado câibras, protrusão abdominal, dor e tremor, o que é consistente com relatos anteriores (DI et al., 2016; MARQUES et al., 2006). Nossos pacientes iniciaram seu quadro clínico com uma síndrome do tipo “fasciculação-câibra”, que progressivamente se associou à dor no membro afetado em 80% deles.

Embora não tenhamos avaliado o tipo de dor nos pacientes do estudo, sabe-se que é uma característica clínica extremamente prevalente em pacientes com esclerose lateral amiotrófica (CHIÒ; MORA; LAURIA, 2017; DELPONT et al., 2018; HANISCH et al., 2015). De localização variada e causas multifatoriais (DELPONT et al., 2018), a dor parece ser ainda mais comum na variante *p.P56S*, podendo se manifestar como sintoma inicial da doença (DI et al., 2016).

A fraqueza do músculo abdominal resultou em protrusão do abdome. O tremor, quando presente, era postural. Nosso estudo não avaliou distúrbios autonômicos e cognitivos, como alterações gastrointestinais e disfunção executiva respectivamente, embora eles tenham sido relatados em outras publicações (ALCÂNTARA et al., 2019; GUO et al., 2020; MARQUES et al., 2006).

Todos os nossos pacientes com ELA8 tiveram seus sintomas inicialmente relatados nos membros inferiores, com quadro clínico predominante compatível com acometimento de neurônio motor inferior. Esse grupo também teve uma maior duração da doença, provavelmente devido à natureza lentamente progressiva (ALCÂNTARA et al., 2019) dessa variante e seu acometimento respiratório tardio (YAMASHITA; ANDO, 2015). Nosso estudo mostrou uma baixa prevalência de acometimento bulbar nos pacientes ELA8, o que também corrobora a maior sobrevida deles, uma vez que a principal causa de óbito nesses pacientes é a falência respiratória (VAN ES et al., 2017).

O estudo de condução nervosa no grupo de pacientes ELA8 foi normal para todos os parâmetros avaliados. Ainda, o estudo da onda F também normal em nossos pacientes diferiu de outras publicações, que apontam principalmente para o aumento da latência da onda F na esclerose lateral amiotrófica (INGHILLERI; IACOVELLI, 2011; JOYCE; CARTER, 2013). Essa diferença pode ter ocorrido pelo grau de

acometimento dos pacientes avaliados no momento da realização do estudo de condução nervosa.

A eletromiografia de agulha nos pacientes ELA8 estudados está em acordo com o reportado na literatura para a ELA (INGHILLERI; IACOVELLI, 2011; JOYCE; CARTER, 2013). Além da baixa prevalência de acometimento bulbar nos pacientes ELA8 deste estudo, chama a atenção também a ausência de potenciais de fasciculação em um deles que, embora incomum, sabe-se ser um achado possível na esclerose lateral amiotrófica (JOYCE; CARTER, 2013).

A perda de massa muscular com lipossustituição pôde ser evidenciada através da ressonância magnética de coxa em um de nossos pacientes ELA8 (FIGURA 5). Esse achado é consistente com já reportado em outros estudos (DIAMANTI et al., 2019; KLICKOVIC et al., 2019), inclusive tendo sido proposto como biomarcador da doença e para auxílio diagnóstico em músculos de difícil acesso pela ENMG, como no caso de pacientes com acometimento bulbar oligossintomáticos (DIAMANTI et al., 2019).

## 7 CONCLUSÃO

A ELA8 representa um pequeno e raro grupo dentre os pacientes com ELA. A esclerose lateral amiotrófica acomete mais homens do que mulheres, porém a mutação *p.P56S* esteve presente mais em mulheres do que em homens em nosso estudo.

A idade média dos pacientes ELA8 foi discretamente inferior à dos pacientes não-ELA8. O mesmo ocorreu com a idade média de início dos sintomas entre os grupos.

Todos os pacientes ELA8 possuíam algum familiar também afetado pela doença, enquanto no grupo não-ELA8 a minoria relatou história de familiares com sintomas semelhantes.

Os achados clínicos mais relevantes nos pacientes ELA8 quando comparados com os não-ELA8 foram tremor, dor, câibras e, principalmente, protrusão abdominal. Em todos os pacientes ELA8 os sintomas iniciaram nos membros inferiores, com acometimento motor predominante compatível com lesão de neurônio motor inferior.

Todos os pacientes ELA8 tiveram o estudo de condução nervosa e onda F normais. Na eletromiografia de agulha, apenas um paciente ELA8 não possuía potenciais de fasciculação nos segmentos estudados; todos os demais apresentaram alterações compatíveis com denervação ativa, denervação crônica e potenciais de fasciculação em pelo menos três segmentos corporais. O segmento bulbar foi o menos afetado.

A ressonância magnética de coxa esquerda de um paciente ELA8 evidenciou perda de massa muscular com lipossustituição.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi o primeiro a publicar a maior série de pacientes com ELA8 já reportada no sul do Brasil e de famílias não relacionadas entre si. Esse é um fato extremamente relevante, considerando-se a raridade dessa doença e sua íntima relação com a população brasileira, colaborando com a epidemiologia dessa variante tanto em território nacional quanto internacionalmente.

Nossos resultados são consistentes com estudos anteriores e ratificam várias características clínicas que podem ser particulares da ELA8. Isso sugere que os médicos devem suspeitar dessa variante quando estiverem presentes suas manifestações cardinais: câibra, protrusão abdominal, dor e tremor.

Quanto às limitações do estudo, destacamos: o reduzido tamanho da amostra de pacientes; a seleção dos mesmos ter ocorrido em uma coorte regional (viés de seleção); apenas os casos-índice foram revisados no grupo ELA8; no grupo não-ELA8, os dados clínicos foram obtidos principalmente do prontuário médico, que é avaliador-dependente e, algumas vezes, apresentaram-se incompletos e, embora houvesse pacientes com ELA familiar no grupo não-ALS8, eles não foram investigados para outras mutações genéticas.

Assim, ressaltamos que mais investigações são necessárias para elucidar a epidemiologia da ELA8 e suas particularidades. Recomendamos também que a mutação *p.P56S* do gene *VAPB* seja incluída em todas as triagens genéticas para ELA familiar em brasileiros.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, O. et al. ALSod: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics. **Human Mutation**, v. 33, n. 9, p. 1345–1351, 1 set. 2012.
- AL-CHALABI, A. et al. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 81, n. 12, p. 1324–1326, 2010.
- AL-CHALABI, A. et al. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: A population-based modelling study. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 11, p. 1108–1113, 1 nov. 2014.
- ALCÂNTARA, C. DE et al. Amyotrophic lateral sclerosis type 8 is not a pure motor disease: evidence from a neuropsychological and behavioural study. **Journal of Neurology**, 2019.
- ALSoD**. Disponível em: <<https://alsod.ac.uk/>>. Acesso em: 31 out. 2020.
- ARNOLD, A.; EDGREN, D. C.; PALLADINO, V. S. AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: Fifty Cases Observed on Guam\*. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 117, n. 2, 1953.
- ARORA, R. D.; KHAN, Y. S. **Motor Neuron Disease**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2020.
- BÄUMER, D. et al. Progressive hemiparesis (Mills syndrome) with aphasia in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology**, v. 82, n. 5, p. 457–458, 4 fev. 2014.
- BECCARI, M. S. **A VAPB e a Esclerose Lateral Amiotrófica**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 1 fev. 2016.
- BRASIL. Lei Nº 13.709 de 14 de agosto de 2018. . 2018.
- CHATTOPADHYAY, D.; SENGUPTA, S. First evidence of pathogenicity of V234I mutation of hVAPB found in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 448, n. 1, p. 108–113, 23 maio 2014.
- CHEN, H. J. et al. Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 40266–40281, 17 dez. 2010.
- CHIÒ, A.; MORA, G.; LAURIA, G. Pain in amyotrophic lateral sclerosis. **The Lancet Neurology**, Lancet Publishing Group, 1 fev. 2017.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. **N**Brasil, 2007. Disponível em: <<https://sistemas.cfm.org.br/normas/visualizar/resolucoes/BR/2007/1821>>
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. **No Titl**Brasil, 2018. Disponível em: <<https://sistemas.cfm.org.br/normas/visualizar/resolucoes/BR/2018/2218>>

COSTA, J.; SWASH, M.; M, DE C. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review. **Archives of Neurology**, v. 69, n. 11, p. 1410–1416, 2012.

DE ALCÂNTARA, C. et al. Amyotrophic lateral sclerosis type 8 is not a pure motor disease: evidence from a neuropsychological and behavioural study. **Journal of Neurology**, 14 maio 2019.

DE CARVALHO, M. et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, n. 3, p. 497–503, mar. 2008.

DELPONT, B. et al. Clinical features of pain in amyotrophic lateral sclerosis: A clinical challenge. **Revue Neurologique**, v. 6427, n. 1, p. 1 YP – 118, jan. 2018.

DI, L. et al. Atypical familial amyotrophic lateral sclerosis with initial symptoms of pain or tremor in a Chinese family harboring VAPB-P56S mutation. **Journal of Neurology**, v. 263, n. 2, p. 263–268, 1 ago. 2016.

DIAMANTI, L. et al. A pilot study assessing T1-weighted muscle MRI in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Skeletal Radiology**, v. 48, n. 4, p. 569–575, 1 abr. 2019.

DIETRICH-NETO, F. et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: 1998 national survey. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, n. 3 A, p. 607–615, 2000.

ELMAN, L. B.; MCCLUSKEY, L. Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis and other forms of motor neuron disease. Em: **UpToDate**. [s.l.] John F Dashe, 2016.

FGA, S. P.; DE LIMA, J. M. B.; ALVARENGA, R. P. Epidemiologia da Esclerose Lateral Amiotrófica-Europa/América do Norte/América do Sul/Ásia. Discrepâncias e similaridades. Revisão sistemática da literatura. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 45, n. 2, p. 5–10, 15 out. 2009.

FINKEL, N. A forma pseudomiopática tardia da atrofia muscular progressiva heredo-familiar. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 20, n. 4, p. 307–322, dez. 1962.

GASTAUT, J. L.; BARTOLOMEI, F. Mills' syndrome: Ascending (or descending) progressive hemiplegia: A hemiplegic form of primary lateral sclerosis?. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, BMJ Publishing Group, 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7931406/>>. Acesso em: 14 dez. 2020

GEEVASINGA, N. et al. Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. **Nature Reviews Neurology**, Nature Publishing Group, , 1 nov. 2016.

GENEVINI, P. et al. VAPB depletion alters neuritogenesis and phosphoinositide balance in motoneuron-like cells: Relevance to VAPB-linked amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 7, p. 235176, 1 abr. 2019.

GOETZ, C. G. Amyotrophic lateral sclerosis: Early contributions of Jean-Martin Charcot. **Muscle and Nerve**, John Wiley & Sons, Ltd, , 1 mar. 2000. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/%28SICI%291097-4598%28200003%2923%3A3%3C336%3A%3AAID-MUS4%3E3.0.CO%3B2-L>>. Acesso em: 28 out. 2020

GOOCH, J. W. Missense Mutation. In: GOOCH, J. W. (Ed.). . **Encyclopedic Dictionary of Polymers**. 2. ed. New York: Springer-Verlag New York, 2011. p. 908–908.

GRAD, L. I. et al. **Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)** Cold Spring Harbor perspectives in medicine Cold Spring Harb Perspect Med, , 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28003278/>>. Acesso em: 1 ago. 2020

GUO, X. et al. Peripheral nerve pathology in VAPB-associated amyotrophic lateral sclerosis with dysautonomia in a Chinese family. **Clinical Neuropathology**, v. 39, n. 6, 8 maio 2020.

HANISCH, F. et al. Characteristics of pain in amyotrophic lateral sclerosis. **Brain and Behavior**, v. 5, n. 3, p. 8, 1 mar. 2015.

HARDIMAN, O. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17071, 31 jul. 2017.

INGHILLERI, M.; IACOVELLI, E. Clinical neurophysiology in ALS. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 149, n. 1, p. 57–63, 2011.

JAISER, S. R. et al. Mills' syndrome revisited. **Journal of neurology**, v. 266, n. 3, p. 667–679, mar. 2019.

JOYCE, N. C.; CARTER, G. T. Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis. **PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation**, v. 5, n. 5 Suppl, p. S89–S95, maio 2013.

KANEKURA, K. et al. Characterization of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked P56S Mutation of Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein B (VAPB/ALS8). **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 30223–30233, 31 jul. 2006.

KATZ, J. S.; DIMACHKIE, M. M.; BAROHN, R. J. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Perspective. **Neurologic Clinics**, v. 33, n. 4, p. 727–734, 2015.

KIM, G. et al. **ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies** Neuron Cell Press, , 2020. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S089662732030653X/fulltext>>. Acesso em: 31 out. 2020

KLICKOVIC, U. et al. Skeletal muscle MRI differentiates SBMA and ALS and correlates with disease severity. **Neurology**, v. 93, n. 9, p. E895–E907, 2019.



KOSAC, V. et al. Familial adult spinal muscular atrophy associated with the VAPB gene: report of 42 cases in Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 10, p. 788–90, out. 2013.

LINDEN JUNIOR, E. et al. Prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in the city of Porto Alegre, in Southern Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 71, n. 12, p. 959–962, 1 dez. 2013.

MARAGAKIS, N. J.; GALVEZ-JIMENES, N. Epidemiology and pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. In: UPTODATE (Ed.). . **Post TW**. [s.l.] UpToDte, 2020.

MARIN, B. et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, p. dyw061, 1 ago. 2016.

MARQUES, V. D. et al. Expanding the phenotypes of the Pro56Ser VAPB mutation: Proximal SMA with dysautonomia. **Muscle and Nerve**, v. 34, n. 6, p. 731–739, 2006.

MARQUES, V. D.; MARQUES, W. J. Neurophysiological Findings of the Late-Onset, Dominant, Proximal Spinal Muscular Atrophies With Dysautonomia Because of the VAPB PRO56SER Mutation. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 25, n. 4, 2008.

MASRORI, P.; VAN DAMME, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. **European Journal of Neurology**. Blackwell Publishing Ltd, 1 out. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7540334/?report=abstract>. Acesso em: 31 out. 2020

MATHIS, S. et al. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. **Journal of the Neurological Sciences**. Elsevier B.V., 15 abr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30870681/>. Acesso em: 31 out. 2020

MEJZINI, R. et al. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now?. **Frontiers in Neuroscience**. Frontiers Media S.A., 6 dez. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6909825/?report=abstract>. Acesso em: 31 out. 2020

MILLS, C. K. A case of unilateral progressive ascending paralysis, probably representing a new form of degenerative disease. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 27, n. 4, p. 195–200, 1900.

MITNE-NETO, M. et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 18, p. 3642–3652, 2011.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **VAPB Gene ID 9217**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9217>. Acesso em: 2 nov. 2020.

NIEDERMEYER, S.; MURN, M.; CHOI, P. J. Respiratory Failure in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Chest**. Elsevier Inc, 1 fev. 2019. Disponível em: <http://journal.chestnet.org/article/S0012369218310547/fulltext>. Acesso em: 2 nov. 2020

NISHIMURA, A. L. et al. A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late-Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **The American Journal of Human Genetics**, v. 75, n. 5, p. 822–831, nov. 2004.

NISHIMURA, A. L.; AL-CHALABI, A.; ZATZ, M. A common founder for amyotrophic lateral sclerosis type 8 (ALS8) in the Brazilian population. **Human genetics**, v. 118, n. 3–4, p. 499–500, dez. 2005.

PRADO, L. DE G. R. et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: Case series and review of the Brazilian literature. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 17, n. 3–4, p. 282–288, 31 jul. 2016a.

PRADO, L. DE G. R. et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: Case series and review of the Brazilian literature. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 17, n. 3–4, p. 282–288, 1 ago. 2016b.

RICHIERI-COSTA, A. et al. Autosomal dominant late adult spinal muscular atrophy, type finkel. **American Journal of Medical Genetics**, v. 9, n. 2, p. 119–128, 1 jan. 1981.

RIVA, N. et al. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 263, n. 6, p. 1241–1254, 1 ago. 2016.

ROSEN, D. R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**, v. 362, n. 6415, p. 59–62, 1993.

SALAMEH, J.; BROWN, R.; BERRY, J. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Review. **Seminars in Neurology**, v. 35, n. 04, p. 469–476, 1 ago. 2015.

SERVIER MEDICAL ART. **Nervous system Archives**. Disponível em: <<https://smart.servier.com/category/anatomy-and-the-human-body/nervous-system/>>. Acesso em: 2 nov. 2020.

SHAHRIZAILA, N. et al. Amyotrophic lateral sclerosis and motor neuron syndromes in Asia. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 87, n. 8, p. 821–830, 1 ago. 2016.

SOUZA, P. V. S. DE et al. Clinical and genetic basis of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 12, p. 1026–1037, 21 jun. 2015.

SRIVALI, N.; RYU, J. H.; RABATIN, J. T. Respiratory failure as the presenting manifestation of amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia**, 2016.

STATLAND, J. M. et al. Patterns of Weakness, Classification of Motor Neuron Disease, and Clinical Diagnosis of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Neurologic Clinics**, v. 33, n. 4, p. 735–748, 2015.

SU, X. W. et al. Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: Implications for

clinical practice and research: ALS Genetics. **Muscle & Nerve**, v. 49, n. 6, p. 786–803, 1 ago. 2014.

SWINNEN, B.; ROBBERECHT, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 11, p. 661–670, 22 maio 2014.

TAKEDA, T.; KITAGAWA, K.; ARAI, K. Phenotypic variability and its pathological basis in amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropathology**, v. 40, n. 1, p. 40–56, 5 fev. 2020.

TALBOTT, E. O.; MALEK, A. M.; LACOMIS, D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 138p. 225–238.

TATENO, F. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis Presenting Respiratory Failure as the Sole Initial Manifestation. **Case Reports in Neurology**, v. 6, n. 2, p. 213–216, 2014.

TRILICO, M. L. C. et al. Characterization of the amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of the VAPB gene in Southern Brazil. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 21, n. 3–4, p. 286–290, 2020.

VAN BLITTERSWIJK, M. et al. VAPB and C9orf72 mutations in 1 familial amyotrophic lateral sclerosis patient. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 12, p. 2950.e1-2950.e4, 1 dez. 2012.

VAN DEN BOS, M. A. J. et al. **Pathophysiology and diagnosis of ALS: Insights from advances in neurophysiological techniques**International Journal of Molecular SciencesMDPI AG, , 1 jun. 2019.

VAN ES, M. A. et al. **Amyotrophic lateral sclerosis**The LancetLancet Publishing Group, , 4 nov. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617312874>>. Acesso em: 1 ago. 2020

WERNECK, L. C. et al. A clinical epidemiological study of 251 cases of amyotrophic lateral sclerosis in the south of Brazil TT - Estudo clínico epidemiológico de 251 casos de esclerose lateral amiotrófica no sul do Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, n. 2A, p. 189–195, 2007.

WIJESEKERA, L. C. et al. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. **Neurology**, v. 72, n. 12, p. 1087–1094, 24 mar. 2009.

World Medical Association declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. **JAMA - Journal of the American Medical Association**American Medical Association, 27 nov. 2013. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/1760318>>. Acesso em: 27 jun. 2020

YAMASHITA, S.; ANDO, Y. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. **Translational Neurodegeneration**, v. 4, n. 1, 1 ago. 2015.

ZAREI, S. et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. **Surgical Neurology International**, v. 6, p. 171, 2015.

ZOU, Z. Y. et al. Familial flail leg ALS caused by PFN1 mutation. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**. BMJ Publishing Group, , 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://jnnp.bmj.com/content/91/2/223>>. Acesso em: 31 out. 2020

## APÊNDICE 1 – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Registro:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Gênero: ( ) Masc ( ) Fem

Cidade de nascimento: \_\_\_\_\_ Cidade de procedência: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Doença: \_\_\_\_\_ Idade de início dos sintomas: \_\_\_\_\_

Data de início dos sintomas: \_\_\_\_\_ Data da primeira consulta: \_\_\_\_\_

História familiar da doença: ( ) Sim ( ) Não

Se história familiar presente, descrever membros afetados e informações relevantes:

\_\_\_\_\_

Alterações em membros SUPERIORES: ( ) Não ( ) Sim Quais? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Alterações em membros INFERIORES: ( ) Não ( ) Sim Quais? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Membro de início dos sintomas: \_\_\_\_\_

Iniciou Unilateral ou Bilateral? \_\_\_\_\_

Presença de tremor: ( ) Não ( ) Sim Descreva o tremor: \_\_\_\_\_

Dor no membro afetado: ( ) Não ( ) Sim

Fasciculação: ( ) Não ( ) Sim Locais de fasciculação: \_\_\_\_\_

Cãibras: ( ) Não ( ) Sim Locais de cãibras: \_\_\_\_\_

Protrusão abdominal: ( ) Não ( ) Sim

Hiporreflexia, hiperreflexia ou arreflexia?: ( ) Não ( ) Sim Qual? \_\_\_\_\_

Eletroneuromiografia apresenta: ( ) Não ( ) Sim Se sim:

Data da ENMG: \_\_\_\_\_ Tempo sintoma-ENMG: \_\_\_\_\_

Desnervação ativa: ( ) Não ( ) Sim

Desnervação crônica: ( ) Não ( ) Sim

Potencial de Fasciculação: ( ) Não ( ) Sim

Quantidade de segmentos afetados: \_\_\_\_\_ Quais? \_\_\_\_\_

Laudo descritivo da ENMG: \_\_\_\_\_

---

---

Teste genético realizado: ( ) Não ( ) Sim

Resultado pronto: ( ) Não ( ) Sim      Se sim, é *VAPB*?: ( ) Não ( ) Sim

Outros resultados do teste genético: \_\_\_\_\_

Ressonância presente: ( ) Não ( ) Sim      Se sim, qual a data: \_\_\_\_\_

Laudo da ressonância: \_\_\_\_\_

---

## APÊNDICE 2 - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA “AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND FRONTOTEMPORAL DEGENERATION”

*Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 2020; 0: 1–5



### ARTICLE

### Characterization of the amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of the *VAPB* gene in Southern Brazil

MATHEUS LUIS CASTELAN TRILICO<sup>1</sup> , PAULO JOSÉ LORENZONI<sup>2</sup>,  
CLÁUDIA SUEMI KAMOI KAY<sup>2</sup>, RENATA DAL PRA DUCCI<sup>2</sup>,  
OTTO JESUS HERNANDEZ FUSTES<sup>2</sup>, LINEU CESAR WERNECK<sup>2</sup> &  
ROSANA HERMINIA SCOLA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Service of Neuromuscular Disorders, Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil, and <sup>2</sup>Service of Neuromuscular Disorders, Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil

#### Abstract

**Objective:** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare worldwide heterogeneous neurodegenerative disease with sporadic and familial (FALS) forms. A rare autosomal dominant subtype of FALS was identified in a Brazilian family, classified as ALS type 8 (ALS8) linked to the *VAPB* gene. The aim of our study was to analyze a series of ALS8 patients from unrelated families in order to further characterize the disease. **Methods:** We reviewed only patients with probable or definite ALS according to the Awaji criteria being managed at a single center between 2004 and 2018 and with DNA samples available for genetic analysis. A retrospective analysis of clinical, laboratory, and electrophysiological features was performed, relevant data were recorded and DNA was analyzed to detect *VAPB* gene mutation. **Results:** Thirty-one ALS patients were eligible for genetic screening for ALS8 and the mutation was detected in five patients from unrelated families. The mean age of onset was  $45 \pm 5.3$  years for the ALS8 group and  $47.6 \pm 13.1$  years for the non-ALS8 group and the time between symptom onset and last follow-up was longer for ALS8 patients. Three patients in the ALS8 group had tremor (60%), four had pain in affected limb (80%) and all had cramps and abdominal protrusion. **Conclusions:** This study presents the largest series of ALS8 patients in southern Brazil. Our findings demonstrate several clinical features that may be characteristic of ALS8 and confirm that clinicians should suspect ALS8 when the clinical manifestations include cramps, abdominal protrusion, pain, and tremor.

**Keywords:** Amyotrophic lateral sclerosis, motor neuron disease, *VAPB*

#### Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare worldwide heterogeneous neurodegenerative disease (1). Its epidemiology is not well described; variable rates of incidence and prevalence have been reported (2). The average age of onset is approximately 61 years (3). Sporadic ALS is the most common form, accounting for approximately 90% of cases; the remaining are due to familial ALS (FALS) (4). Various subtypes of FALS have been genetically classified. Their frequencies vary by geographic region.

In 2004, a rare autosomal dominant subtype of FALS was identified in a large Brazilian family (5)

which was later linked to a heterozygous p.P56S mutation of the vesicle-associated membrane protein-associated protein B (*VAPB*) gene mapped at the locus 20q13.3 (6). *VAPB* is present in all tissues, but for unknown reasons, cellular degeneration only occurs in anterior horn spinal cord motor neurons (7). Usually, p.P56S is a missense *VAPB* mutation that manifests in two main phenotypes: amyotrophic lateral sclerosis (ALS: OMIM #608627) and spinal muscular atrophy (SMA: OMIM #182980) (5,7). When, linked to the *VAPB* gene FALS is classified as ALS type 8 (ALS8). ALS8 progression is slower than the sporadic form, with more evident lower motor neuron

Correspondence: Matheus Luis Castelan Trilico, Service of Neuromuscular Disorders, Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), General Carneiro, 181, Alto da Glória, Curitiba, Paraná 80060-900, Brazil. Email: matheus.trilico@gmail.com

(Received 18 November 2019; revised 9 February 2020; accepted 23 February 2020)

ISSN 2167-8421 print/ISSN 2167-9223 online © 2020 World Federation of Neurology on behalf of the Research Group on Motor Neuron Diseases  
DOI: 10.1080/21678421.2020.1738495



degeneration starting in the lower limbs (8). In addition, specific clinical findings have been reported in ALS8: pain, tremor, cramps (9), abdominal protrusion, lipid, autonomic disturbance (10) and cognitive impairment (8).

Few ALS8 families have been described. In Brazil, ALS8 is mostly restricted to the southeast region and its epidemiology is unclear (11). The aim of our study was to analyze a series of ALS8 patients from unrelated families in order to further characterize the disease.

### Materials and methods

We reviewed all ALS cases being managed at the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brazil) between 2004 and 2018. Only patients with probable or definite ALS according to the Awaji criteria (12) with DNA samples available for genetic analysis were included in this study. We excluded patients with a confirmed diagnosis of other neuromuscular diseases, relatives of patients with known neuromuscular disorders, patients aged < 14 years, and those without DNA samples.

A retrospective analysis of clinical, laboratory, and electrophysiological features was performed. Relevant data, including current age; age at onset; gender; other affected family members; clinical findings, course, and outcome and electromyographic findings were recorded.

Peripheral venous blood samples were collected in EDTA-coated vacuum tubes. DNA was extracted from lymphocytes using a modified phenol/chloroform method. The *VAPB* gene was analyzed by polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP) and Sanger sequencing. Initially, DNA was analyzed by PCR/RFLP to detect a pathogenic point mutation due to a C-to-T transition at nucleotide 166 of the exon 2 of the *VAPB* gene (c.166C > T; p.P56S; p.Pro56Ser) using a previously described method (13). If the patient was heterozygous for the p.P56S variant, the diagnosis of ALS8 was confirmed. In patients with the detected mutation, Sanger sequencing was additionally performed in exon 2 to analyze the p.P56S variant [method under request]. Sequencing was performed using a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan). Sequences obtained were compared with the revised genomic reference of the *VAPB* gene.

After identification of the common *VAPB* mutation, the patients were reexamined and their clinical data reviewed ("double checked"). The patients were then grouped according genetic status: ALS8 (ALS associated with p.P56S variant)

and non-ALS8 (ALS without p.P56S variant). Clinical findings were compared between groups.

The study was approved by the Local Ethics Committee for Human Research of the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná and conducted in accordance with ethical principles. Written informed consent was obtained from all participants.

### Results

Thirty-one ALS patients were eligible for genetic screening for ALS8. Patient clinical and demographic characteristics are summarized in Table 1. The p.P56S variant in the *VAPB* gene was detected in five patients (2 male and 3 female) from unrelated families (age range 45–63 years; median 54 years; mean  $55 \pm \text{SD}$  years). Genetic analysis for the p.P56S variant revealed no mutation in the 26 patients (14 male and 12 female) from unrelated families (age range 37–76 years; median 59.5 years; mean  $56.9 \pm \text{SD}$  years). The mean age of onset was  $45 \pm 5.3$  years (median 43 years) for the ALS8 group and  $47.6 \pm 13.1$  years (median 46 years) for the non-ALS8 group. The time between symptom onset and last follow-up was longer for ALS8 patients ( $10.4 \pm 6.7$  years) than non-ALS8 patients ( $7.7 \pm 6.1$  years).

Other affected relatives were reported in both groups (Table 1). In the ALS8 group, all patients (100%) had another affected relative. In the non-ALS8 group, seven patients (26%) reported relatives with similar symptoms.

Three patients in the ALS8 group had tremor (60%), four had pain in affected limb (80%) and all had cramps and abdominal protrusion (Figure 1).

Table 1. Patient clinical and demographic characteristics.

	ALS8 (n = 5)	Non-ALS8 (n = 26)	Total
Gender			
Male	2	14	16
Female	3	12	15
Age (years)			
Minimum	45	37	
Maximum	63	76	
Mean ( $\pm \text{SD}$ )	55 ( $\pm 7.5$ )	56.9 ( $\pm 11.5$ )	
Age of symptom onset (years)			
Minimum	40	24	
Maximum	51	67	
Mean ( $\pm \text{SD}$ )	45 ( $\pm 5.3$ )	47.6 ( $\pm 13.1$ )	
Disease follow-up* (years)			
Minimum	3	1	
Maximum	20	22	
Mean ( $\pm \text{SD}$ )	10.4 ( $\pm 6.7$ )	7.7 ( $\pm 6.1$ )	
Familial History			
Yes	5	7	
No	0	19	

ALS8: Amyotrophic Lateral Sclerosis type 8;  $\pm \text{SD}$ : Standard Deviation; \*: since symptom onset.





Figure 1. Protrusion of the abdomen in the ALS8 patient.

Table 2. Main clinical findings characteristic of ALS8.

	ALS8 (n = 5)		Non-ALS8 (n = 26)	
	YES (%)	NO (%)	YES (%)	NO (%)
Tremor	3 (60%)	2 (40%)	3 (11.5%)	23 (88.4%)
Pain in affected limb	4 (80%)	1 (20%)	14 (53.8%)	12 (46.2%)
Cramps	5 (100%)	0 (0%)	10 (38.4%)	16 (61.5%)
Abdominal protrusion	5 (100%)	0 (0%)	1 (3.8%)	25 (96.1%)

ALS8: Amyotrophic Lateral Sclerosis type 8.

Table 3. Main individualized clinical findings in each ALS8 patient.

Patient ID	Gender	Age of onset (years)	Disease duration (years)	Site of onset	MNp	Tremor	Cramps	Abdominal protrusion
07	F	40	21+	Spinal (IL/BI)	LMN	Yes	Yes	Yes
14	M	48	15+	Spinal (IL/BI)	LMN	Yes	Yes	Yes
23	F	41	6+	Spinal (IL/UN)	LMN	Yes	Yes	Yes
31	F	43	10+	Spinal (IL/BI)	LMN	No	Yes	Yes
32	M	51	3+	Spinal (IL/UN)	No	No	Yes	Yes

Patient ID refers exclusively to the patient's identification in our database. F: female; M: male; IL: inferior limb; SL: superior limb; UN: unilateral; BI: bilateral; MNp: motor neuron predominance; No: without a motor neuron predominance; LMN, lower motor neurons; +: alive.

In the non-ALS8 group, most had no such findings and abdominal protrusion was present in only one patient (3.8%). Table 2 shows the comparison of clinical data from both groups. All ALS8 patients reported that symptoms started in the lower limbs. In contrast, 19 non-ALS8 patients (73%) had symptom onset in the upper limbs. Table 3 clarifies the main individualized clinical findings in each ALS8 patient and shows that in all patients the site of onset was spinal with the inferior limbs being primarily affected.

### Discussion

ALS8 is an important genetic subtype of ALS in Brazil, however there are few studies regarding this and other subtypes of amyotrophic lateral sclerosis in our country. Previously published ALS studies in Brazil were focused in the southeast, mainly in the states of Minas Gerais and São Paulo (13).

Although one previous ALS study was conducted in southern Brazil (14), this is the largest series of unrelated ALS8 families reported from this region of the country.

The p.P56S mutation in the *VAPB* gene is considered a common founder for ALS8 in the Brazilian population and probably associated with the Portuguese colonization of Brazil (15). Previous studies of Brazilian patients have found the same mutation as a common variant associated with ALS8 (11,13,16). Therefore, it is recommended to screen for the p.P56S mutation when ALS8 is suspected. This study provides further support of these concepts. We suggest that genetic screening for the p.P56S mutation should be performed in adult patients with ALS when another family member is affected (FALS).

The average age at symptom onset in ALS8 in our study population was consistent with previous studies (17) and probably due to reduced levels of

VAPB that are critical for motor neuron survival in the fourth and fifth decades of life (18). However, the age at symptom onset in the non-ALS8 group was lower than has been reported elsewhere (2,19), which is probably due to the presence of patients with other familial forms than the one studied.

In this study, all ALS8 patients had symptom onset in the lower limbs. This group also had a longer disease duration, which is likely due to the slowly progressive nature (8) of this variant and later respiratory involvement (20). On the other hand, the survival of the non-ALS8 group was higher than has been previously reported (21,22). This may be due to the presence of patients with slowly progressive variants, such as the “flail arm” (23).

Our study sought common clinical changes among ALS8 patients, who presented with cramps, abdominal protrusion, pain, and tremor, which is consistent with previous reports (9,10). These patients started with “fasciculation-cramp-like syndrome” that progressively became associated with pain in the affected limb. In addition, abdominal muscle weakness eventually resulted in protrusion of the abdomen. Tremor, when present, was postural. This study did not evaluate autonomic and cognitive disorders, although they have been previously reported (8,10).

Some limitations of our study should be noted. First, the patient sample size was small and selected from a regional cohort, which may have introduced selection bias. Second, only the index cases were reviewed in the ALS8 group; other affected relatives were not examined so it is possible that the number of affected family members was not correctly estimated, even though autosomal dominant inheritance was confirmed. Third, in the non-ALS8 group, clinical data was mostly obtained from the medical record, which is evaluator-dependent. Lastly, even though there were patients with FALS in the non-ALS8 group, they were not investigated for other FALS-related genes.

## Conclusion


This study presents the largest series of ALS8 patients in southern Brazil. Our findings are consistent with previous studies and demonstrate several clinical features that may be characteristic of ALS8. Our data confirm that clinicians should suspect ALS8 when the clinical manifestations of ALS include cramps, abdominal protrusion, pain, and tremor. However, the small number of patients from a single region in southern Brazil limited our study. Further investigation is needed to elucidate the epidemiology of ALS8 and its particular characteristics. Multicenter studies are

necessary to further quantify the prevalence of undiagnosed ALS8 in the Brazilian population. Furthermore, we recommend that the p.P56S mutation of the *VAPB* gene be included in all genetic screening for Brazilian FALS.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

## ORCID

Matheus Luis Castelan Trilico  <http://orcid.org/0000-0003-4417-1277>

## References

1. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logrosino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17071. Available at: <http://www.nature.com/articles/nrdp201771>. Accessed March 05, 2020.
2. Marin B, Boumédiène F, Logrosino G, Couratier P, Babron M-C, Leutenegger AL, et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol [Internet]* 2016;46:57–74. Available at: <https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/dyw061>. Accessed March 05, 2020.
3. Su XW, Broach JR, Connor JR, Gerhard GS, Simmons Z. Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical practice and research. *Muscle Nerve*. 2014;49:786–803. Available at: <http://online.library.wiley.com/doi/10.1002/mus.24198/full>. Accessed Jun 21, 2014.
4. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int*. 2015;6:171. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4653353/>. Accessed March 05, 2020.
5. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HCA, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet [Internet]*. 2004;75:822–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372378>. Accessed July 22, 2019.
6. Kanekura K, Nishimoto I, Aiso S, Matsuoka M. Characterization of amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8). *J Biol Chem*. 2006;281:30223–33. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M605049200>. Accessed August 01, 2006.
7. Kosac V, Freitas M. d, Prado FM, Nascimento OJM, Bittar C. Familial adult spinal muscular atrophy associated with the VAPB gene: report of 42 cases in Brazil. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2013;71:788–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212516>. Accessed September 12, 2019.
8. Alcântara C, De Maroco M, Marcondes C, Jr, Teixeira CF, de Souza LC. Amyotrophic lateral sclerosis type 8 is not a pure motor disease: evidence from a neuropsychological and behavioural study. *J Neurol [Internet]* 2019;266:1980–1987. Available at: Accessed March 05, 2020.

9. Di L, Chen H, Da Y, Wang S, Shen X-M. Atypical familial amyotrophic lateral sclerosis with initial symptoms of pain or tremor in a Chinese family harboring VAPB-P56S mutation. *J Neurol*. 2016;263:263–8. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00415-015-7965-3>. Accessed March 05, 2020.
10. Marques VD, Barreira AA, Davis MB, Abou-Sleiman PM, Silva WA, Zago MA, et al. Expanding the phenotypes of the Pro56SerVAPB mutation: Proximal SMA with dysautonomia. *Muscle Nerve*. 2006;34:731–9. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/mus.20657>. Accessed March 05, 2020.
11. Beccari MS. A VAPB e a Esclerose Lateral Amiotrófica [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2016. Available at: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-18012016-155440/>. Accessed July 22, 2019.
12. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* [Internet]. 2008;119:497–503. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18164242>. Accessed July 23, 2020.
13. Prado L de GR, Bicalho ICS, Vidigal-Lopes M, Ferreira CJA, Mageste Barbosa LS, Gomez RS, et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: Case series and review of the Brazilian literature. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener* [Internet]. 2016;17:282–8. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21678421.2016.1143011>. Accessed March 05, 2020.
14. Werneck LC, Bezerra R, Silveira Neto O. d, Scola RH. A clinical epidemiological study of 251 cases of amyotrophic lateral sclerosis in the south of Brazil TT – Estudo clínico epidemiológico de 251 casos de esclerose lateral amiotrófica no sul do Brasil. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2007; 65:189–95. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-282X2007000200001&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2007000200001&lang=pt). Accessed September 12, 2019.
15. Nishimura AL, Al-Chalabi A, Zatz M. A common founder for amyotrophic lateral sclerosis type 8 (ALS8) in the Brazilian population. *Hum Genet*. 2005;118:499–500. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16187141>. Accessed September 12, 2019.
16. de Alcântara C, Cruzeiro MM, França MC, Camargos ST, de Souza LC. Amyotrophic lateral sclerosis type 8 is not a pure motor disease: evidence from a neuropsychological and behavioural study. *J Neurol*. 2019; 266:1980–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31089860>. Accessed June 30, 2019.
17. Yamashita S, Ando Y. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl Neurodegener*. 2015;4:13. Available at: <http://www.translationalneurodegeneration.com/content/4/1/13>. Accessed March 05, 2020.
18. Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MCN, Bengtson MH, Joazeiro CA, Tsuda H, et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011;20:3642–52. Available at: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/20/18/3642.abstract>. Accessed March 05, 2020.
19. Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2016. p. 225–38. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029732000136>. Accessed March 05, 2020.
20. Li H-F, Wu Z-Y. Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2016;5:3. Available at: <http://www.translationalneurodegeneration.com/content/5/1/3>. Accessed March 05, 2020.
21. Shahrizaila N, Sobue G, Kuwabara S, Kim SH, Birks C, Fan DS, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and motor neuron syndromes in Asia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87:821–30. Available at: <http://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp-2015-312751>. Accessed March 05, 2020.
22. Riva N, Agosta F, Lunetta C, Filippi M, Quattrini A. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2016;263:1241–54. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-016-8091-6>. Accessed March 05, 2020.
23. Salameh J, Brown R, Berry J. Amyotrophic lateral sclerosis: review. *Semin Neurol*. 2015;35:469–76. Available at: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1558984>. Accessed March 05, 2020.